

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANDRÉ LUIZ WATANABE

Suplementação de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) e derivados na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Pirassununga

2006

ANDRÉ LUIZ WATANABE

Suplementação levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) e derivados na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a Elisabete Maria Macedo Viegas.

Pirassununga

2006

Aos meus pais, Kengo e Antonia, a minha irmã Akemi, aos meus padrinhos Ary e Antonia. Amo vocês.

Dedico

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Elisabete Maria Macedo Viegas, pelos ensinamentos e confiança. Desejo que estes sejam apenas os primeiros de muitos anos de convivência e amizade. É inestimável a contribuição que sua orientação me proporcionou. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino e ao Prof. Dr. Leandro Portz pela amizade e orientação profissional, que durante minha graduação me incentivaram e propiciaram condições para que eu ingressasse neste programa de mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade de São Paulo e por sua vez à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

À SUPREMAIS Produtos Bioquímicos Ltda, Valinhos/SP, na pessoa do Dr. José Eduardo Butolo, pela doação do suplemento vitamínico e mineral utilizado na composição das dietas experimentais.

À Usina Santo Antônio pela doação dos ingredientes testados.

À Piscicultura Águas Claras, Mococa-Sp, Universidade de Marília, Marília-SP e Duke Energy Brasil, Salto Grande-SP representados respectivamente por Sr. Martinho Colpani Filho, Dr. Carlo R. del Carratore e Dr. Rodolfo Nardez Sirol, pela doação dos peixes utilizados neste estudo.

Aos professores Dr. João Alberto Negrão, Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, Dr^a Catarina Abdalla Gomide, Dr. Raul Franzolin Neto, Dr. César Gonçalves de Lima, Dr^a. Elyara Maria Pereira da Silva, Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro e Dr. Marcus Antonio Zanetti pelo auxílio na realização das análises, pelas “dicas” fornecidas, fundamentais à conclusão do presente trabalho.

Aos técnicos de laboratório Nilton Pedro dos Santos, Ricardo F. Oliveira, Sandra A. de Oliveira, Roseli Sengling Lacerda e José Aparecido da Cunha pelo apoio

Ao técnico responsável do laboratório de aquicultura José Apolinário Ferraz, pela imprescindível ajuda e principalmente pela amizade.

Ao Msc. Marcelo Assano (Japinha) pela grande ajuda prestada na confecção (extrusão) das rações.

Aos amigos Hamilton Hisano e Leonardo Tashibana pelas ajuda e pela amizade.

Ao Prof. Margutti, pelo incentivo às práticas esportivas e pela amizade.

Aos estagiários do curso de zootecnia da FZEA/USP: Mariene Miyoko Natori, Andréia Donizete Chagas, Daniel Fuziki Umezu, João Vinícius Brombim, Denis Takasaki Ahn e Frederico Issao Tomiita pela ajuda durante a realização dos trabalhos e pela amizade.

À todos meu colegas de pós graduação desta faculdade, pela convivência.

Aos meus familiares, principalmente meus tios José Carlos e Maria da Graça, meus primos pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos Peter Gaberz Kirschnik, Paulo Roberto Campagnoli de Oliveira Filho, Franco Dany Akira Pimenta, Juliana Pola Durães e Adriana C. Baroni pela amizade e pela grande ajuda durante a condução dos experimentos.

A minhas amigas Ligia Uribe Gonçalves, Aline Zampar, Andréa Brasil (Lua), Andréa Luciana dos Santos, Gabriela Guizzi Damasceno, Letícia Sanches, Evelise Andreatta, Márcia B. Sgambatti, Tatiana R. Garcia, Milena A. de Souza, Roselane B. Matos, Raquel Helena Fernandes, Juliane Renata Gaiotto, Fernanda Paiva e principalmente a Eliane Gil Gatto. Muito obrigado a todas vocês pela amizade, companheirismo, ajuda em meu trabalho e pelos bons momentos que passamos juntos. Sempre lembrarei de vocês minhas caras!

Aos meus amigos Felipe de Macedo, Gilson A. Gomes (Doug), Luiz Gustavo Rombola e Weber Vilas Boas Soares pelo companheirismo, amizade e apoio em todos os momentos. Vocês são muito importantes para mim, meus caros!

Aos meus amigos Marco Aurélio de Felício Porcionato, Leonardo Takamassa Otsuka e Ricardo (Saraiva), pela amizade e pelos bons momentos em que convivemos juntos.

À Deus, sem ele nada é possível.

“Feliz daquele que consegue conhecer as causas das coisas.”

Virgílio

Resumo

WATANABE, A.L. Suplementação de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) e derivados na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), 2006. 82 F. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

O uso de sub-produtos oriundos do processo de produção de álcool etílico na alimentação animal, pode ser uma excelente alternativa no aumento da eficiência alimentar das rações, reduzindo o custo do cultivo na aquicultura. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de dois níveis (2,5 e 5,0%) de levedura íntegra desidratada - LI (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus derivados, autolisado – LA e parede celular - PC, em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Foram avaliados parâmetros de desempenho produtivo, composição corporal e plasmática, índices hepato e víscero somáticos, e determinados os coeficientes de digestibilidade dos ingredientes-teste por meio das técnicas “in vivo” e “in vitro”. No teste de desempenho utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 +1, correspondente a três ingredientes-teste, dois níveis e mais uma dieta controle - C (sem levedura ou derivados), empregando-se 5 repetições com peixes cada, totalizando 350 juvenis de pacu (12,0 g e 8,5 cm). Foram formuladas 7 dietas isoprotéicas (26% PD kg⁻¹ de ração) e isoenergéticas (3.100 kcal ED kg⁻¹ ração), contendo os níveis crescentes de cada ingrediente (LI2,5; LI5,0; LA2,5; LA5,0; PC2,5 e PC5,0). As dietas foram fornecidas *ad libitum*, duas vezes ao dia durante 90 dias, monitorando-se diariamente os parâmetros químicos da água. Os índices zootécnicos avaliados foram: consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), sobrevivência (S), taxas de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência protéica (TEP) e ganho de peso individual total (GPA), além dos índices víscero (IVS) e hepato (IHS) somáticos, composição corporal e plasmática (uréia, ácido úrico, glicose, proteína e cortisol) verificados ao final do período de alimentação. Para determinação dos coeficientes

de digestibilidade aparente dos ingredientes-teste foi utilizado o marcador inerte óxido de cromo. Adicionalmente foram determinados os valores digestíveis da proteína dos ingredientes-teste, por meio da técnica “in vitro”. Não houve ocorrência de mortalidade em nenhuma das unidades experimentais. De modo geral, a utilização da levedura e derivados acarretou melhora da eficiência alimentar e da utilização protéica. Entretanto, apenas PC5,0 e LA2,5 tiveram efeito positivo significativo na TEP e na CA respectivamente, em relação ao tratamento controle. A composição de carcaça e níveis plasmáticos não foram afetados pela suplementação dos ingredientes-teste para o pacu. Os coeficientes de digestibilidade aparente obtidos para LI e PC para a proteína e energia foram menores ($P < 0,05$) que os coeficientes da LA. O emprego da metodologia “in vitro” pode ser utilizado como alternativa na determinação da digestibilidade da fração protéica dos alimentos para o pacu. Entretanto, em função das características do ingrediente utilizado, os valores podem ser superestimados, em comparação aos valores “in vivo”.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, derivados de levedura, desempenho produtivo, digestibilidade.

Abstract

WATANABE, A.L. Effect of supplementation of dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and its by-products in feeding juveniles of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), 2006. 82f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

The use of by-products from ethyl alcohol production in the animal nutrition, can be a excellent alternative for the increase of feed efficiency, reducing the costs of production in aquaculture. This study was conducted to evaluate the inclusion of two levels (2.5 e 5.0%) of dried yeast - LI (*Saccharomyces cerevisiae*) and its by-products, disrupted yeast cells - LA and yeast cell wall - PC, in diets for juveniles of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Productive pattern performance, body and plasmatic composition, hepato and viscera somatic indexes such as determination of digestibility coefficient of the test ingredients by means of “in vivo” and “in vitro” techniques were evaluated. Performance test was conducted with 350 pacu juveniles (12.0 g and 8.5 cm), using delineation completely randomized in a factorial (3 X 2+ 1), corresponding to three test ingredients, two levels and a control diet – C (without yeast or by-products), with five replication with ten fishes each. Seven isoproteic (26 % DP) and isoenergetic (3,100 kcal DE) diets were formulated containing increasing levels of each ingredient (LI2.5; LI5.0; LA2.5; LA5.0; PC2.5 and PC5.0). The diets were supplied for 90 days, “ad libitum” twice a day and the chemical parameters of the water were daily monitored. The performance parameters evaluated were: feed intake (CR), feed conversion (CA), survival, specific growth rate (TCE), proteic efficiency rate (TEP), individual weight gain (GPA), viscero (IVS) and hepato (IIHS) somatic indexes, body and plasmatic composition (urea, uric acid, glucose, plasmatic protein and cortisol) verified at the end of feeding. To determine apparent digestibility coefficients of the test ingredients it was used the chromic oxide inert marker. In addition, digestive values of the test ingredients protein were determined by means of “in vitro” technique. During the experiment no mortality was observed. In general,

using yeast and by-products increased feed efficiency and proteic use. However, only PC5.0 and LA2.5 were observed positive significant effects ($P < 0.05$) for TEP and CA respectively, comparing to the control diet. Carcass composition and plasmatic levels were not affected by of the test ingredients supplementation for pacu. The apparent digestibility coefficients obtained for LI and PC for protein and energy were lower ($P < 0.05$) than LA coefficients. The “in vitro” methodology can be used as an alternative to determine the digestibility of proteic portion of pacu food. However, according to the characteristics of the ingredient used, values can be superestimated, comparing to “in vivo” values.

Key words: *Piaractus mesopotamicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast by-products, productive performance, digestibility.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Fluxograma simplificado da obtenção da levedura autolisada e parede celular a partir das células íntegras (SGARBIERI et al. 1999).....	8
Figura 2. Sistema de aquários utilizados no ensaio desempenho.....	32
Figura 3. Sistema de eliminação de poluentes da água.....	32
Figura 4. Aquários de coleta de fezes.....	33
Figura 5. Tanques de alimentação utilizados no ensaio de digestibilidade.....	33
Figura 6. Extrusora Exteec utilizada para confecção das deitas experimentais.....	36
Figura 7. Forno a gás utilizado para secagem da rações após processo de extrusão.....	36
Figura 8. Biometria (comprimento total) dos pacus aos 90 dias de alimentação.....	41
Figura 9. Necropsia e pesagem dos pacus após 90 dias de alimentação.....	41
Figura 10. Coleta de sangue da veia caudal.....	45
Figura 11. Placas utilizadas nas leituras das concentrações dos índices plasmáticos.....	46
Figura 12. Equipamento utilizado para leitura das concentrações plasmáticas (leitor ELISA)	47

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estudos envolvendo a ação de imunostimulantes para espécies aquáticas	29
Tabela 2. Parâmetros da qualidade de água (média \pm desvio padrão) observados durante a condução do experimento.	31
Tabela 3. Composição centesimal ¹ dos ingredientes utilizados na formulação das dietas para o ensaio de desempenho e digestibilidade “in vivo”	35
Tabela 4. Formulação e composição analisada das dietas experimentais utilizadas nos ensaios zootécnicos e de digestibilidade (ração referência)	38
Tabela 6. Composição centesimal das dietas testes utilizadas nos ensaios de digestibilidade	40
Tabela 7. Descrição das análises realizadas durante o experimento	48
Tabela 8. Valores médios do Consumo de Ração (CR), Ganho de Peso Individual Total (GPA), Conversão Alimentar (CA), Taxa de Eficiência Protéica (TEP), Taxa de Crescimento Específico (TCE), Índice Víscero-somático (IVS) e Índice Hepato-somático (IHS) para o pacu	50
Tabela 9. Valores médios de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral na composição corporal dos pacus alimentados com as dietas teste	57
Tabela 10. Valores médios dos índices plasmáticos de glicose, proteína, uréia, ácido úrico e cortisol dos pacus após 90 dias de alimentação	60
Tabela 11. Valores dos coeficientes de Digestibilidade Aparente do Nutriente (CDA) e os respectivos valores da proteína (PD) e energia digestíveis (ED) dos ingredientes, obtidos por meio de duas metodologias de cálculo.....	65
Tabela 12. Valores digestíveis da proteína da levedura e derivados, determinados pelo método “in vitro”	65

Sumário

1.	Introdução	1
2.	Revisão de Literatura	3
2.1.	O pacu e a piscicultura	3
2.2.	A importância da levedura	4
2.3.	Os derivados da levedura íntegra	7
2.4.	Aditivos (pró-nutrientes) e imunostimulantes	12
3.	Objetivos	30
4.	Material e Métodos.....	30
4.1.	Local, Condições Experimentais e Delineamento	30
4.2.	Ingredientes e Rações.....	34
4.2.1	Dietas Desempenho	37
4.2.2.	Dietas do ensaio de digestibilidade	39
4.3.	Desempenho Zootécnico e Índices Corporais	40
4.4.	Ensaio de digestibilidade “in vivo” e “in vitro”	43
4.5.	Testes Plasmáticos	45
4.6.	Análise estatística e Químico-Bromatológicas	47
5.	Resultados e Discussão.....	49
5.1.	Desempenho	49
5.2.	Composição de Carcaça	56
5.3.	Parâmetros Plasmáticos.....	59
5.4.	Ensaio de Digestibilidade	64
6.	Conclusões	69
	Referências	70

1. Introdução

A produção mundial de peixes de água doce sofreu incremento aproximado de 15,9 para 23,8 milhões de toneladas métricas (aumento de 49%), durante o período de 1996 a 2002, enquanto a prática extrativista aumentou de 7,4 para 8,7 milhões de toneladas (17%) (ANUALPEC, 2005).

Verifica-se no panorama brasileiro um aumento superior da taxa de cultivo de pescados de água doce, em relação à produção gerada pela prática extrativista. Tal fato reflete-se por pequena diminuição nas importações de pescado (aproximadamente 5,0% entre os anos de 2001 e 2004), por aumento no consumo per capita interno e também pela maior demanda por produtos frescos e congelados (filés) destinados à exportação, resultando neste mesmo período, em aumento aproximado de 600% para filés frescos e 70% para congelados. Dentre os maiores importadores estão França, Reino Unido, Itália, Alemanha e Estados Unidos.

Em função desta crescente demanda e em decorrência de diversos fatores peculiares, torna-se essencial o desenvolvimento de pacotes tecnológicos com a finalidade de obter produção eficiente, ecologicamente correta e a um custo de produção reduzido, principalmente para as espécies nativas.

Neste sentido, o emprego de dietas nutricionalmente eficiente e de baixo custo, pode ser fundamental para o sucesso do processo produtivo uma vez os gastos destinados à nutrição podem representar até 70% do custo de produção. Na prática, dietas menos onerosas podem ser obtidas a partir do emprego de ingredientes de baixo valor comercial, geralmente vinculado à grande disponibilidade deste produto e/ou subproduto no mercado.

Na região sudeste, em decorrência da atual situação do setor sucro-alcooleiro, destaca-se a levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*), como produto secundário oriundo do processo de produção de álcool etílico, como uma importante alternativa para a composição de dietas animais. Além da alta disponibilidade e preço acessível, principalmente em comparação com ingredientes protéicos de origem animal, sabe-se que a levedura seca é ótima fonte de nutrientes e adicionalmente,

possui em sua composição substâncias preconizadas por aumentar a eficiência produtiva animal.

Para tanto, é essencial a realização de estudos que esclareçam os benefícios que o uso da levedura seca e derivados podem proporcionar especificamente ao pacu, tornando possível o uso destes ingredientes na nutrição desta espécie.

2. Revisão de Literatura

2.1. O pacu e a piscicultura

Entre as espécies de peixes mais cultivadas, destaca-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887), pertencente a família Serrasalmidae, com hábito alimentar onívoro e encontrado originalmente na bacia do Prata, é considerado uma das principais espécies brasileiras mais promissoras quanto ao potencial de produção, principalmente pela viabilidade produtiva e apelo comercial. Em estabelecimentos destinados à pesca esportiva (pesque-pague), no estado de São Paulo, verifica-se que a frequência da utilização das espécies chamadas “redondas” representa 14% do total (VENTURIERI, 2002). Além da comercialização envolvida com a prática esportiva, deve-se salientar que a aceitação desta espécie por empresas que processam pescados gera demanda por matéria prima de boa qualidade.

Em decorrência deste panorama, a intensificação da produção nos criatórios promove, cada vez com maior frequência, a ocorrência de situações que prejudicam o equilíbrio do sistema hospedeiro-parasito-ambiente, evidenciados por deficiências nutricionais, patologias infecciosas/parasitárias e redução da qualidade de água, podendo por fim, ocasionar perda na produtividade. Paralelamente, outros fatores também podem facilitar a ocorrência de doenças e a proliferação de organismos oportunistas, como a incorreta escolha da espécie cultivada em função do sistema de produção empregado, programa nutricional, sanitário, e o monitoramento da qualidade de água inadequado (MARTINS, 2004), podendo interferir, de maneira individual ou conjunta, no processo de homeostasia dos indivíduos da espécie, tornando-os mais sensíveis às infecções (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2002).

Nota-se que no estado de São Paulo, dentre as espécies que possuem maior importância comercial, o *Piaractus mesopotamicus* tem-se mostrado como uma das mais afetadas por este tipo de ocorrência. Nos anos de 1999 e 2000 observaram-se

no CAUNESP (Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista), os maiores índices de freqüência de enfermidades e ataques de parasitos relatados para o pacu, 24 e 19% respectivamente em cada ano, seguido pelo tambacu, 22 e 22% e piauçu, 18 e 15% (MARTINS, 2004).

2.2. A importância da levedura

A levedura é um fungo unicelular amplamente utilizado na alimentação animal, em processos industriais e biotecnológicos. Uma das formas encontradas é a levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*), resíduo da indústria sucroalcooleira gerado a partir do processo de fermentação etanólica, após processos de centrifugação e secagem em condições definidas. A obtenção da levedura de recuperação pode ser realizada por três maneiras: sangria do leite de levedura, fundo de dorna e vinhaça, sendo que a composição química pode variar de acordo com o tipo de substrato utilizado, grau de aeração do meio, espécie de levedura, tratamentos impostos ao meio de cultura e concentração de sais (BUTOLO, 2002). O processo de obtenção do produto final (levedura seca) também pode acarretar alterações em seu valor nutricional. A secagem da biomassa pode ser realizada por meio de dois processos: (a) rolos rotativos, cujo princípio do método baseia-se no contato do leite de levedura em superfície aquecida (até 200°C) e (b) "spray-dryer" que utiliza a combinação da atomização do leite em pequenas partículas em contato com ar quente ocasionando secagem instantânea (MOREIRA et al. 2002). O menor tempo de secagem e a temperatura empregada neste último processo acarreta melhoria no valor nutritivo da levedura seca, em comparação ao rolo rotativo (FARIA et al. 2000).

Para cada 1000 L de álcool etílico produzidos, são gerados de 20 a 30 kg de levedura seca (BUTOLO, 2002). Considerada a produção anual de álcool em 15 bilhões de L (AGRIANUAL, 2005) pode-se deduzir a obtenção de aproximadamente 375 mil toneladas anuais de *S. cerevisiae* desidratada, para o atual patamar de produção deste setor. De acordo com estimativa apresentada no AGRIANUAL,

calcula-se que a safra 2013/14 deverá gerar produção aproximada de 28 bilhões de L de álcool, duplicando a produção deste resíduo. Além do setor sucro-alcooleiro dois outros importantes setores industriais produzem a levedura em suas linhas de processamento: o cervejeiro e o de panificação, ambos comparativamente, com potencial de geração residual menor que o primeiro setor (OZÓRIO; IFTODA; CYRINO, 2003).

Segundo Marques, Oetterer e Horii (1998), as vantagens na utilização da levedura na nutrição animal seriam: (a) rápida taxa de crescimento de biomassa; (b) alta concentração protéica, (c) grande variedade de substratos, inclusive de resíduos industriais, que podem ser considerados como potenciais fontes produtoras de microrganismos, (d) produção facilmente viabilizada, independente da condição climática, pela eficiência na utilização de água e espaço físico e, (e) viabilidade da aplicação de técnicas biotecnológicas, que podem permitir alterações químicas, estruturais e/ou fisiológicas com intuito de adequar o emprego destes organismos a uma determinada função utilização.

Na prática, a utilização da levedura *S. cerevisiae* na formulação de dietas para diferentes espécies animais, inclusive organismos aquáticos, ocorre mais frequentemente em função do seu alto valor nutritivo: 43% de proteína bruta, com altos valores em aminoácidos essenciais (lisina 3,5% e treonina 3,5%), 3.000 kcal/kg de energia disponível, 0,8% de fósforo e como fonte de vitaminas hidrossolúveis (BACCARIN; PEZZATO, 2001; OZÓRIO; IFTODA; CYRINO, 2003).

Diversos estudos foram realizados com peixes onívoros enfocando os níveis de inclusão e suas implicações no uso da *S. cerevisiae* quanto à performance de crescimento, eficiência alimentar, digestibilidade, qualidade de carcaça, eficiência protéica e energética entre outros parâmetros. No Brasil, destacam-se estudos com a tilápia nilótica (WATANABE; RIBEIRO; ANTUNES, 2001, BACCARIN; PEZZATO, 2001; CARVALHO, 2002; OZÓRIO; IFTODA; CYRINO, 2003, HISANO, 2005), híbridos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, e tambaqui, *Colossoma macropomum* (SOUZA, 1989), pacu (PÁDUA, 1996; OZÓRIO; CYRINO; NASCIMENTO 2004), pintado (GAIOTTO, 2005) e jundiá, *Rhamdia quelen* (PIAIA; RAÜNZ NETO, 1997).

De modo geral o valor protéico das leveduras é considerado bom, representado por uma faixa de 75-90% do valor da caseína (VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000), porém apresenta como fator limitante a baixa quantidade de aminoácidos sulfurados, representados pela metionina e cistina. A espessa parede celular e o elevado teor de ácidos nucléicos (RNA) podem restringir a total utilização da levedura na alimentação humana e de animais monogástricos. Além disso, a alta ingestão de levedura seca e/ou de ácidos nucléicos pode elevar a concentração de uratos (ácido úrico) no sangue e nos tecidos do animal, ocasionando distúrbios fisiológicos relacionados ao metabolismo dos carboidratos, lipídico e proteínas (RUMSEY et al. 1991a; MARQUES, OETTERER; HORII, 1998; SGARBIERI et al. 1999). Além disso, Caballero-Córboba e Sgarbieri (2000) citam que o excesso de ácido úrico pode causar alterações nos rins (pedras) e fígado (lesões).

Rumsey, Winfree e Hughes (1992), estudaram a resposta da truta arco íris (*O. mykiss*) à suplementação crescente de ácidos nucléicos (0,6 a 4,1% na dieta) e verificaram que à medida que houve aumento na quantidade de proteína da alimentação, ocorreram significativos ($P < 0,05$) incrementos na taxa de crescimento e de retenção de nitrogênio pelos indivíduos, o que demonstra a habilidade destes peixes em utilizar o nitrogênio desta natureza para síntese e deposição de tecido protéico. A inclusão máxima de ácidos nucléicos foi realizada através administração de 50% de *S. cerevisiae* na dieta. Ainda no mesmo estudo, os autores avaliaram o fracionamento de nitrogênio do extrato de RNA oriundo da levedura e encontraram, respectivamente, 12,5; 5,4 e 5,8% para o nitrogênio total, nitrogênio total dos ácidos nucléicos e dos aminoácidos.

A utilização da levedura na alimentação dos peixes está correlacionada em parte, à capacidade da utilização do nitrogênio não protéico. Rumsey et al. (1991a) avaliaram níveis crescentes (0, 25, 50 e 75%) de levedura seca na dieta da truta arco íris (peso inicial 2,6 g). Níveis acima de 25 % acarretaram redução do desempenho e da conversão alimentar dos animais induzido inclusive por diminuição da quantidade da dieta ingerida, relacionada à depreciação da palatabilidade do alimento devido ao excesso de ácidos nucléicos presente nas dietas. Adicionalmente, observou-se acréscimo da atividade da uricase,

demonstrando desta forma, a capacidade fisiológica desta espécie em metabolizar o nitrogênio presente nos ácidos nucléicos.

Alguns trabalhos avaliaram a utilização da proteína microbiana na nutrição do pacu. Pádua (1996) estudou os efeitos da substituição da farinha de peixe pela levedura seca de destilaria alcoólica em dietas para juvenis de pacu, sobre aspectos metabólicos, produtivo e de composição de carcaça. A substituição de até 75% (29,88% de inclusão total na dieta) não causou efeito negativo nos parâmetros avaliados por um período de alimentação de até 87 dias. A troca total da fonte protéica animal pela microbiana (39,80% na dieta) propiciou redução do crescimento, alterações na composição corporal e altas taxas de mortalidade. Ainda, quanto à avaliação metabólica, estes animais apresentaram hiperglicemia e reduzidas taxas de proteína plasmática e glicogênio hepático.

Ozório, Cyrino e Nascimento (2004) avaliaram o efeito da substituição da farinha de peixes pela levedura seca, oriunda da produção de sucro-alcooleira em dietas para o pacu. Em função dos tratamentos (0, 10, 15, 20, 30 e 40% de *S. cerevisiae* na dieta) foram obtidos e avaliados alguns índices zootécnicos e composição corporal ($26,6 \pm 1,7$ g peso inicial) alimentado por período de 54 dias. A substituição total da levedura não causou alteração na composição corporal do *P. mesopotamicus*, com exceção do teor de lipídeo que foi significativamente menor ($P < 0,05$) na dieta 0%. De forma geral, a inclusão de até 30% garantiu os melhores índices de desempenho e de eficiência na utilização de proteína dietética sem propiciar efeitos indesejáveis na saúde dos animais e na taxa de consumo do alimento.

2.3. Os derivados da levedura íntegra

Os derivados da levedura são obtidos através do processamento das células integras. A produção do autolisado baseia-se no rompimento da célula (parede celular), por autólise mecânica ou enzimática, fazendo com que o conteúdo

citoplasmático fique exposto ao meio externo. Posteriormente, por centrifugação, a parede celular é obtida através da separação do conteúdo plasmático (Figura 1).

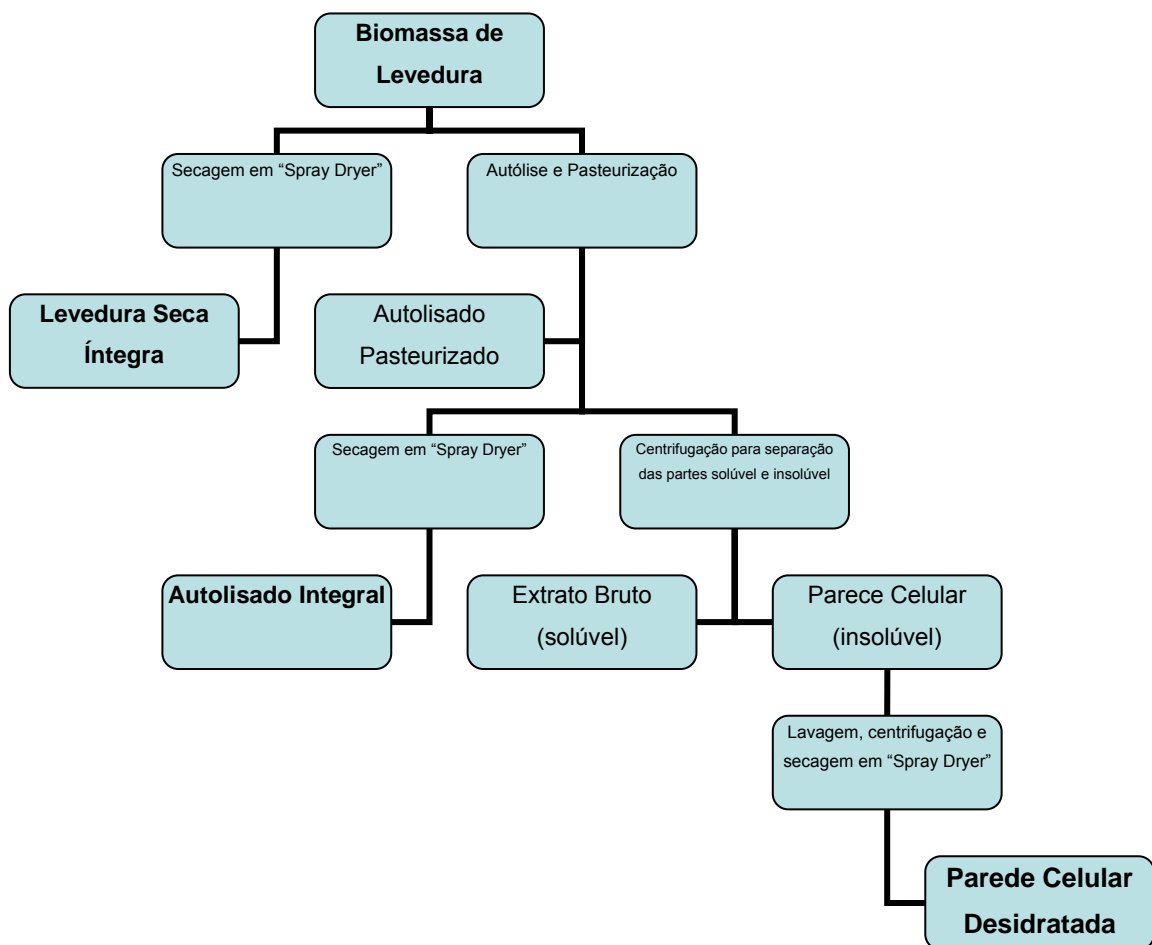


Figura 1. Fluxograma simplificado da obtenção da levedura autolisada e parede celular a partir das células íntegras (SGARBIERI et al. 1999).

O autolisado pode ser amplamente utilizado na indústria de alimentos como flavorizante e suplementos nutritivos fornecedores de proteínas, minerais e vitaminas do complexo B (CABALLERO-CÓRDOBA; PACHECO; SGARBIERI, 1997; SGARBIERI et al. 1999; CABALLERO-CÓRDOBA; SGARBIERI, 2000; VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000ab; PÁDUA; OLIVEIRA; SGARBIERI, 2000).

Sgarbieri et al. (1999), avaliaram a composição da levedura íntegra e seus derivados, autolisado e parede celular, provenientes da produção de cervejaria. Obtiveram respectivamente os valores de 48,74; 46,5 e 32,70% para proteína bruta, onde a quantidade de RNA fez 5,70; 7,90 e 1,83% do nitrogênio total. A quantidade em fibra bruta foi de 24,40; 25,03 e 55,04%, e a parte insolúvel foi representada por 1,88; 0,27 e 23,45%, respectivamente para cada fonte. O incremento da quantidade de ácidos nucleicos verificado nas amostras com células rompidas, segundo os autores, pode ser proveniente do aumento da solubilidade deste componente em função do processo de autólise. O perfil de aminoácidos mostrou-se dentro do padrão teórico apresentado pela FAO/WHO com exceção ao material autolisado, o qual apresentou pequena deficiência em aminoácidos sulfurados totais. Os valores encontrados para aminoácidos na levedura íntegra, autolisada e na parede celular foram seguidamente (mg/100mg de proteína): 7,13; 9,54 e 8,31 para lisina, 2,50; 1,21 e 1,56 para metionina e 6,16; 5,84 e 7,18 para a treonina. Outro ponto interessante observado pelos autores, foi a presença de grande quantidade de ácido glutâmico, aproximadamente 13 mg/100mg de proteína, que é empregado como palatabilizante na dieta de peixes (LI; GATLIN III, 2006). Portanto, pode-se verificar que além da boa qualidade nutricional da *S. cerevisiae*, o processamento deste resíduo pode gerar alterações dos valores nutricionais sem necessariamente reduzir a qualidade destes ingredientes.

Vilela, Sgarbieri e Alvim (2000) também encontraram, na avaliação comparativa dos perfis de aminoácidos, deficiência em sulfurados (metionina mais cistina) apenas no autolisado (15,6% inferior), em relação ao padrão FAO/WHO. Entretanto esta deficiência não foi verificada por Yamada et al. (2003), que avaliaram o valor protéico e a composição da levedura e derivados, provenientes do processo de fermentação etanólica (células íntegras, autolisado e extrato), em relação ao padrão FAO/WHO para crianças de 2 a 5 anos, onde os valores determinados para a levedura íntegra e autolisado, foram respectivamente: 39,6 e 40,4% (proteína bruta), ácido ribonucleico (9,0 e 5,6%), fibra total (31,4 e 31,2%) e fibra insolúvel (1,1 e 1,0%). Para as mesmas fontes, os valores da composição em aminoácidos (g/100 gramas de proteína) foram: 7,8 e 9,0 (lisina); 2,4 e 2,7 (metionina + cistina); 1,2 e 1,5

(triptofano) e 4,7 e 5,2% para a treonina. Adicionalmente também foi realizada a determinação da digestibilidade da proteína em ratos da linhagem *Wistar* (machos, 21 dias) e, como esperado, observou-se maiores valores digestíveis para o autolisado (76,6%) seguido pela levedura íntegra (68,0%).

Rumsey, et al. (1991b) comparam os valores digestíveis da levedura íntegra (LI), da “quebrada” por ação mecânica (LA), e a fração protéica da levedura (LP) na alimentação de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). A ruptura das células melhorou o valor nutricional das mesmas, elevando em mais de 30% o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína (LI: 63,2%; LA: 87,4% e LP: 87,3%), e 10% da energia bruta (62,6%; 68,6% e 70,5%) e da energia metabolizável (11,46; 12,69 e 16,53 MJ/kg). Os autores justificaram o incremento nos valores encontrados para a proteína, como sendo resultantes da remoção do material oriundo da parede celular, providos de componentes pouco digestíveis, e que influenciam de forma negativa a absorção dos nutrientes presentes no meio intracelular.

Deste modo, pode-se notar que a composição nutricional das leveduras pode variar não só em decorrência dos processos à que são submetidas, mas também quanto à origem e meio em que são cultivadas quando comparado com valores de composição apresentados (SCARINCI; UMANSKY; MENDOZA, 1990; BENASSI; CAMARGO; CIACCO, 1990; RUMSEY, et al. 1991b; RUMSEY; WINFREE; HUGHES, 1992; CABALLERO-CÓRDOBA; PACHECO; SGARBIERI, 1997; MARQUES; OETTERER; HORII, 1998; SGARBIERI et al. 1999; CABALLERO-CÓRDOBA; SGARBIERI, 2000; YAMADA et al. 2003; OZÓRIO; CYRINO; NASCIMENTO, 2004; HISANO, 2005; LI E GATLIN III, 2006; CHAUD; SGARBIERI, 2006). Entretanto, por outro lado, o processamento da levedura (autólise e fracionamento) permite reduzir, em boa parte, as diferenças do valor nutricional encontrados em ingredientes oriundos da indústria cervejeira e da produção de álcool (YAMADA et al. 2003).

Carvalho (2002) testou a utilização da célula íntegra, autolisada e da parede celular como fonte protéica para a tilápia do Nilo (peso médio inicial 52,0 g). Estas fontes foram adicionadas à dieta (isoenergética e isoprotéica) perfazendo-se 25% da proteína bruta total das rações resultando em inclusões totais de 20,20; 19,80 e

42,50% dos respectivos ingredientes citados anteriormente. Após 30 dias, os peixes alimentados com parede celular apresentaram ganho de peso superior e significativo ($P < 0,05$) em relação a todos os tratamentos, porém devido ao aumento da ingestão de alimento, não se obteve diferença ($P > 0,05$) na eficiência nutricional destes animais. De modo geral, o autor sugere a utilização de levedura autolisada e parede celular na alimentação da tilápia, por acarretarem maiores taxas de crescimento específico e por aumentarem a deposição de proteína na carcaça.

A resposta dos animais alimentados com *S. cerevisiae* e/ou derivados pode variar inclusive, em função das características relacionadas ao hábito e ao sistema digestório das espécies. Gaiotto (2005) utilizando inclusões de 2,5 e 5,0% de levedura íntegra, autolisada e parede celular, não encontrou resultados que inviabilizassem o uso destes pró-nutrientes na alimentação de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). Os animais suplementados com estes ingredientes apresentaram melhores índices de desempenho e de sobrevivência, em comparação ao tratamento controle, adicionalmente não ocorrendo complicações relacionadas ao metabolismo dos nutrientes.

Similarmente, Hisano (2005) também recomenda o uso destes mesmos ingredientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), entretanto utilizando níveis diferentes. Foram empregados os níveis de 1,0; 2,0; e 3,0%, de inclusão na dieta, de levedura íntegra seca e autolisada, e 0,1; 0,2; e 0,3% de parede celular, fornecidos por 80 dias. Em comparação aos valores digestíveis pode-se verificar que as duas espécies apresentaram respostas diferentes. Para a tilápia, o processo de quebra da parede celular causou incremento dos valores digestíveis da proteína deste ingrediente em comparação a célula íntegra. Tal fato não foi evidenciado nos valores determinados para o pintado (GAIOTTO, 2005). O autolisado apresentou o menor valor em contraposição às demais formas de levedura. Além desta variação evidenciada pela comparação entre as fontes, os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína do ingrediente, também apresentaram valores diferentes entre as espécies. Por exemplo, os valores encontrados para a levedura autolisada foram: 72,20% para *O. niloticus* e 28,48% para o *P. coruscans*.

2.4. Aditivos (pró-nutrientes) e imunoestimulantes

Na nutrição animal, além dos estudos concluídos direcionados a utilização de *S. cerevisiae* como fonte protéica, podemos verificar produções mais recentes (principalmente para organismos aquáticos) direcionadas ao estudo do emprego da levedura como aditivo alimentar.

Rosen (1996) descreve um aditivo como uma substância que quando adicionada a outra, em pequenas quantidades, é capaz de gerar propriedades desejáveis, ou quando oportuno eliminá-las. De acordo com Scapinello et al. 2001ab, o modelo de atuação de alguns aditivos no organismo animal, deve-se primeiramente à sua ligação com certas bactérias patogênicas presentes no sistema digestório, inativando-as. Outra forma de ação, mais complexa, seria através da modulação do sistema imunológico mediante processo infeccioso.

Um pró-nutriente pode ser descrito como um micro ingrediente utilizado na alimentação animal e administrado em pequenas quantidades, com a finalidade de causar incremento do valor intrínseco de uma mistura de nutrientes, em uma dieta animal. Este elemento pode ser uma substância orgânica ou inorgânica e/ou um micro ingrediente de origem vegetal ou animal em seu estado natural, fresco, conservado ou ainda, um derivado de um processo industrial, administrados na alimentação animal individualmente ou acrescentados em misturas (ROSEN, 1996, BUTOLO, 2002).

Desta forma, a levedura na sua forma inativa (morta) inclusa na dieta animal caracteriza um pró-nutriente, atuando de forma positiva no incremento da disponibilidade e da eficiência dos nutrientes em uma ração (HISANO et al. 2004). Portanto sua utilização pode nutrir melhor, pela suplementação de nutrientes essenciais ou não, e de compostos como os oligossacarídeos que compõe a parede celular e possuem biofunções específicas.

Li e Gatlin (2004) citam que a via de atuação das leveduras e seus derivados podem ocorrer devido à presença de alguns componentes como: polímeros de

manose ligados a peptídeos (mananoproteínas), polímeros de glucose (glucans) e quitina. Estes compostos são encontrados na parede celular das leveduras (KOLLAR; STURDIK; SAJBIDOR, 1992; SGARBIERI et al. 1999; SCAPINELLO et al. 2001ab) e podem representar em sua composição aproximadamente, 58% de glucans, 40% mananoproteínas e 2% de quitina (RODRÍGUEZ et al. 2003).

As mananas constituem um polímero de manose, encontrado na camada mais exterior da parede celular e podem atuar positivamente no organismo animal, intervindo no processo de colonização de bactérias patogênicas no trato intestinal, neutralização de micotoxinas e na imunoestimulação (ROMERO; GOMEZ-BASAURI, 2003; GRIESHOP, 2003; FLICKINGER, 2003).

Os β glucans são polissacarídeos, abundantes em microrganismos (fungos) e plantas, presentes na composição da parede celular. Numerosos benefícios à saúde humana e animal tem sido descritos para essas substâncias por mais de 50 anos (FREIMUND et al. 2003). Esta molécula é um complexo de glicose unido por ligações β -1-3 e β -1-6, constituindo respectivamente, 50 e 10% da massa da parede celular, geralmente encontrados na camada interna da parede celular (ROMERO; GOMEZ, 2003). Estes compostos são preconizados por melhorar a atividade do sistema imunológico não específico, e pela ausência de efeitos adversos tem sido proposto na aquicultura para aumentar o status de saúde das populações cultivadas (FIGUERAS; SANTARÉM; NOVOA, 1998).

O mecanismo de defesa não específico está presente em todos os seres vivos e é caracterizado por respostas imunológicas que podem ser resultantes de estímulos provindos de diferentes agentes estressores, não ocorrendo assim uma especificidade. Este mecanismo pode ser caracterizado através da ocorrência de alguns eventos como: fagocitose através de neutrófilos e macrófagos, barreiras anatômicas, ação de lisozimas e de proteínas sanguíneas (PEZZATO et al. 2004) além de atividade fagocítica, encapsulação, formação de nódulos, e produção de peptídeos envolvidos no controle microbiano (MISRA, et al. 2004).

A ação do glucan ocorre por meio da estimulação da atividade do sistema imune com ativação das células responsáveis pela atividade de proteção do organismo. Algumas das repostas observadas em função desta estimulação incluem: ativação

dos macrófagos, aumento da atividade fagocítica, elevação da quantidade e ativação dos linfócitos, imunoglobulina plasmáticas e de lisozimas e também aumento da produção de anticorpos (SAKAI, 1999; GAMAM, 2005).

Em decorrência da característica química e do uso incorreto de alguns aditivos promotores de crescimento na alimentação animal, pode ocorrer indução da resistência de bactérias patogênicas à ação destes aditivos além de modificações na obtenção do produto final (LARA-FLORES et al. 2003). Assim, os imunostimulantes representam importante e promissora ferramenta na aquicultura aumentando a resistência das espécies cultivadas ao estresse e ataque de patógenos (BAGNI et al. 2000).

De acordo com Ortuño et al. (2002), fatores relacionados à biocompatibilidade, biogradabilidade, segurança ambiental e saúde humana devem ser considerados na escolha de um imunostimulante. O principal motivo pelo qual a levedura deve ser empregada na nutrição animal deve-se resumidamente à obtenção do aumento da taxa de crescimento a reduzido custo.

Sakai (1999) relata que os imunostimulantes podem proteger os organismos aquáticos de diversas doenças infecciosas e desta forma reduzir a mortalidade dos animais nesta condição, entretanto, não existe a proteção contra todos os perigos existentes. O tempo, a via e dose são parâmetros importantes na ação dos imunostimulantes. O autor afirma não existir um padrão quanto à utilização destes aditivos para garantir a estimulação da atividade imunológica. A administração via oral, injeção ou banhos apresentam resultados variados, positivos ou não. Jeney e Anderson (1993) citam que a administração via injeção pode garantir maior rapidez na resposta imune não específica em relação a utilização de banhos.

Entretanto devido ao manejo e estresse gerado pelos meios de aplicação do tratamento (imersão e injeção), deve-se sempre que possível, dar-se preferência à suplementação na dieta (PEZZATO, 2004). Todavia, este método deve ser estudado para cada tipo de aditivo, pois existe o perigo de existir um longo período de administração/exposição acarretando a redução da resposta imune devido possivelmente a ocorrência de processos na contra mão dos eventos relacionados à imunostimulação (Sakai, 1999).

Ortuño et al. (2002), elaboraram rações contendo 1, 5 e 10 g de levedura íntegra liofilizada/kg de dieta, tendo como objetivo definir a influencia da administração da levedura para o “gilthead seabream” (*Sparus aurata* L., 166,0 ± 16,0 g) como estimulador do sistema imunológico por meio de parâmetros celulares (número de fagócitos, respiração, mieloperoxidase e atividade citotóxica de leucócitos) e humoral (soro). Os resultados obtidos com as doses de 5 e 10 gramas, administradas por quatro semanas, com taxa de alimentação equivalente a 1,0 % do peso vivo ao dia, indicaram maior percentagem de células fagocíticas e também aumento da quantidade de bactérias (*V. anguillarum*) eliminadas. Entretanto apenas duas semanas após o início do fornecimento de levedura observou-se aumento significativo ($P < 0,05$) da atividade respiratória dos leucócitos e da mieloperoxidase no tratamento que continha a maior inclusão de levedura.

Como mencionado anteriormente, a utilização de levedura na alimentação pode ser classificada como a utilização de um aditivo na dieta demonstrado que seu emprego influencia de forma positiva a resposta não específica do sistema imunológico. Li e Gatlin III (2003), em trabalho realizado com híbridos de “striped bass” (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) testaram a inclusão de levedura de cervejaria nas proporções de 1, 2 e 4% de suplementação na dieta. Foi avaliado desempenho de crescimento e efeitos imuno estimulantes. Os peixes alimentados com os tratamentos 1 e 2%, obtiveram bons índices de ganho de peso, 20% maiores comparados aos resultados da dieta controle. Neste trabalho foi realizado desafio com imersão dos peixes em solução com o patógeno *Streptococcus iniae* (dose DL_{50}) resultando, em algumas semanas, em 20% de mortalidade para o tratamento da dieta controle, 10% para 1% de inclusão e nula para os demais. Também foi estudo o efeito da administração de *S. cerevisiae* seca, por longos períodos e seus efeitos no sistema imunológico, ficando explícito que não houve nenhum efeito imuno supressor nos peixes confirmada pela avaliação da alta taxa da produção de radicais oxidativos pelos neutrófilos do sangue, e de superóxido extracelular dos macrófagos, significativamente superior ($P < 0,01$) à dieta basal.

A forma de atuação dos imunoestimulantes sobre o sistema imune não específico foi relatada por Bricknell e Dalmo (2005). Observaram que diferentes

leucócitos podem apresentar diferentes configurações de receptores de reconhecimento, podendo ocorrer variações na resposta imune de acordo com o tipo de ligação do receptor e dos eventos de transmissão dos sinais intracelulares. Deste modo, os autores sugerem uma definição para os imunostimulantes que devem ser classificados como um componente de ocorrência natural capaz de modular o sistema imunológico, aumentando a resistência do hospedeiro contra doenças que são comumente causadas por patógenos. Apesar dos importantes benefícios no emprego destes aditivos na alimentação de organismos aquáticos podem existir fatores que inviabilizem sua utilização. Normalmente eles estão relacionados à tolerância do animal a este tipo de substância, como problemas relacionados à palatabilidade, hierarquia (peixes dominantes podem receber mais imunostimulante) e determinação do tempo de fornecimento. Aqui também se destaca as estratégias de administração que devem receber importante atenção. Banhos podem ser limitados pois, nem sempre poderão garantir eficiente exposição do animal a uma determinada concentração em função do fluxo da água, e também pode ocorrer biodegradação das moléculas em sistemas de recirculação. A administração oral e contínua por sua vez, pode gerar problemas relacionados com a imunossupressão.

O contato com certas substâncias encontradas no meio aquático e/ou no alimento, pode desencadear um processo imunossupressor nos animais expostos a estes compostos. Sahoo e Mukherjee (2001) citam a aflatoxina, encontrada em ingredientes utilizados na formulação de dietas animais. Para verificar a possível inibição dos danos ocasionados pela toxina, em contraste à ingestão do glucan, "rohus", *Labeo rohita* hamilton (39 gramas), foram submetidos a exposição desta toxina, via injeção (1,25 mg aflatoxina B₁/kg peso vivo) sendo estes previamente alimentados ou não, com dieta contendo inclusão de 0,1% de β -1,3 glucan (Sigma, U.S.A.). Os pesquisadores realmente encontraram efeito inibidor do sistema imunológico evidenciado pela redução da atividade fagocítica, da atividade bactericida do plasma e ao incremento da relação albumina:globulina induzidos pela ação do agente estressor. Além da ação benéfica do glucan em relação a estes parâmetros, houve também redução significativa ($P < 0,05$) no índice de mortalidade,

quando realizado desafio com *A. hydrophila*, em relação aos tratamentos controle (sem aflatoxina e glucan) assim como em relação ao tratamento que apenas continha a aflatoxina B₁.

A interação da suplementação da levedura com outros componentes pode gerar melhoria na resposta dos animais. Hisano et al. (2002), testaram a digestibilidade aparente de rações contendo suplementação de zinco e levedura desidratada para tilápia do Nilo e avaliaram a eficiência desta suplementação na função de pró-nutriente. Neste estudo foi concluído que a levedura desidratada (1% na dieta) juntamente com o zinco (300 mg/kg de ração) propiciaram maiores coeficientes de digestibilidade aparente das rações. Os autores também concluíram existir interação positiva entre os níveis de levedura e zinco para os coeficientes da matéria seca, lipídeo total e energia bruta.

O emprego do glucan (MacroGard® - β -1,3/1,6 glucan) juntamente com vitaminas (ácido ascórbico e α -tocoferol) foram eficientes na indução da maior produção de lisozimas em espécimes de “sea bass”, *Dicentrarchus labrax* (414,4 \pm 4 g). Foram utilizados níveis suplementares equivalentes a 500 p.p.m. de cada vitamina e 2% de glucan na dieta fornecida por longo período de administração (40 semanas). Não ocorreu efeito supressor da atividade imune específica, uma vez que ao final do experimento pode-se notar que os níveis de lisozimas tiveram tendência de aumento ($P \leq 0,05$) ao final do período de alimentação, fato este não evidenciado para as dietas que não continham tal adição. Entretanto, não houve diferença ($P > 0,05$) para os índices de proteína plasmática, que poderia indicar indiretamente uma produção diferenciada de albuminas e globulinas envolvidas no processo imunológico (BAGNI et al. 2000).

Misra et al. (2004) afirmam não ocorrer um padrão linear da correlação dose resposta em função do fornecimento de β -glucan e da atividade imune não específica para pós-larvas de camarões *Macrobrachium rosenberguii*, submetidos à imersão de soluções contendo 0 (controle), 5, 10 e 15 mg de glucan/litro. Os pesquisadores observaram que houve grande decréscimo desta correlação, ocasionada por diferença ($P < 0,05$) da atividade das lisozimas entre as concentrações 10 e 15 mg/l, inclusive esta última não diferindo dos resultados

obtidos pelo tratamento controle. O tempo de exposição (1, 2 e 3 horas) das pós-larvas ao imunoestimulante não influenciou a eficiência da ação, em relação aos parâmetros avaliados. Quando os animais foram submetidos a um desafio com o agente patogênico *Vibrio alginolyticus*, os banhos resultaram em maiores índices de sobrevivência para os animais tratados com a dosagem de 10 mg de glucan, porém neste caso, o banho de uma hora apresentou o melhor resultado referente a atividade fagocítica, verificada pelo maior índice da atividade das lisozimas.

Responsáveis pela atividade fagocítica, os macrófagos/monócitos apresentam receptores específicos na superfície de sua membrana e na presença de moléculas de glucan, geram respostas a partir da ativação de genes intracelulares, traduzidas em produção de mediadores (ex.: citocinas e prostaglandinas) e conseqüentemente na produção de moléculas antimicrobianas relacionadas ao processo da atividade imune (JORGENSEN; ROBERTSEN, 1993; BRICKNELL; DALMO, 2005). Desta forma, espera-se que quanto maior a exposição destas células a estes polissacarídeos, maior será a atividade não específica, que pode ser verificada inclusive, pela atividade respiratória destas células gerando radicais oxidativos, responsáveis pela atividade antimicrobiana. Entretanto pode-se notar em experimento conduzido por Jorgensen e Robertsen (1995) a menor e até a supressão total da atividade dos macrófagos de "atlantic salmon", *Salmo salar* L., submetidos a tratamentos com diversas dosagens do polissacarídeo β -1,3 e β -1,6 glucan (MacroGard® - 0,1; 1,0; 10 e 50 μ g/mL). Não foi encontrada correlação linear dose-resposta da concentração de glucan e da atividade respiratória dos macrófagos, avaliada pela produção do radical superóxido (O_2^-), expostos a estas dosagens, pois em 10 μ g não houve efeito e com 50 μ g ocorreu efeito inibitório.

Paralelamente, Sakai (1999) relata não haver relação dose dependente, porém existem evidências que altas dosagens, além de não surtirem efeito na atividade imunológica, podem causar até a inibição deste mecanismo. Desta forma é necessário o estudo da relação entre dosagens, espécies, agentes estressores, tempo e forma de administração com intuito de promover melhorias no desempenho animal já que vários resultados revelam existir correlação positiva entre imunoestimulantes e o potencial do crescimento corporal.

Vários estudos realizados em condição “in vitro” tem demonstrados os efeitos benéficos na estimulação da atividade dos fagócitos (CASTRO et al. 1999). Entretanto os autores relatam que estes efeitos podem variar, inclusive devido a variação das estruturas das moléculas de glucan. Em decorrência de sua conformação, moléculas com maior grau de agregação, podem impedir a interação deste polissacarídeo com os fagócitos, não ocorrendo assim sua estimulação. Similarmente Brown e Gordon (2003) afirmam que em função da variedade de fontes fúngicas, tem-se a obtenção de polissacarídeos com diferentes pesos moleculares e conformações químicas, traduzidas no diferente grau de ramificações, comprimento do polímero e de estruturas terciárias que estão diretamente relacionados ao mecanismo de atuação dos β -glucans nos leucócitos através dos receptores encontrados na superfície destas células (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos).

Couso et al. (2003), demonstraram os efeitos gerados por diferentes fontes comerciais e níveis de glucan (MacroGard®, Fibolse® e VitaStim®) na resistência do “glithead seabream” à infecção de *P. damselae* subespécie *piscicida*. Para cada fonte foram utilizadas doses equivalente a 1 e 10 g de glucan por fonte/kg dieta. Neste trabalho, as dietas que continham altas concentrações de glucan (10,0 gramas) induziram maior resistência dos animais à ação dos patógenos em curto período de tratamento (duas semanas), porém, quando foi avaliado o maior tempo (seis semanas) as altas doses apresentaram efeito supressor. Contrariamente, as menores doses (1,0 g) de glucans foram mais eficientes quando fornecidas por maior período de tempo. Pode-se constatar que as fontes garantiram respostas diferenciadas dos animais em relação à atividade imunológica, quando elas foram comparadas entre si. De maneira geral, o peixes alimentados com MacroGard® apresentaram maior resistência à infecção bactericida. .

Gatlin III e Li (2005) ressaltam que a partir da quarta até a oitava semana, após o emprego da levedura na alimentação do “striped bass” e por meio de um desafio com a bactéria patogênica *S. iniae*, foi possível observar redução na mortalidade dos animais fato este, conjugado com evidencia de maior atividade respiratória dos neutrófilos e dos macrófagos dos rins. Os autores citam não existir indícios de que a

administração de glucans por longos períodos de tempo (até 16 semanas) possa acarretar imunossupressão.

Gannam (2005) relata sobre a existência da imunidade não específica pelos peixes por meio do uso dos glucans, comprovada em alguns trabalhos realizados, nos quais os animais foram submetidos a desafios com bactérias patogênicas, tanto através da administração oral, por injeção ou banho, de forma positiva no aumento da proteção contra a ação destes patógenos. Este autor ainda cita que os pontos de discussão sobre a utilização deste polissacarídeo estão baseados na dose e período ideal de administração, além do exato mecanismo de atuação destes compostos na fisiologia animal. Neste sentido, deve-se encarar a utilização do glucan como agente profilático, além de seu emprego no tratamento de doenças ocasionadas pela ação de patógenos de ação latente e/ou sub letal.

Em pesquisa avaliando a ação do β -glucan (EcoActivaTM – 0,1% na dieta) Cook e colaboradores (2003) obtiveram sucesso na neutralização dos efeitos negativos de estímulos ambientais, normalmente observados no cultivo e/ou desenvolvimento das espécies comerciais traduzidos em nula ou reduzida taxa de crescimento e susceptibilidade a infecções. Foi simulado por meio do emprego da temperatura (24 e 12°C), duas situações diferentes: verão e inverno, ocorrendo inclusive nesta última situação, maior magnitude das respostas dos animais, “snapper” (*Pagrus auratus*, 180 \pm 36 g), à suplementação por glucan. Simultaneamente foi observado o incremento do crescimento e da atividade dos macrófagos em baixas temperaturas, fato que não ocorre naturalmente. Em adição, também não foi verificado efeito supressor do crescimento e da atividade imune, em função de prolongado período (84 dias) de fornecimento de EcoActivaTM, via oral.

Em outro estudo, Jeney et al. (1997) submeteram trutas arco íris, *O. mykiss* (200 a 300 g), a estímulos estressores provenientes do processo de transporte destes animais. Na tentativa de neutralizar ou reduzir os efeitos negativos deste manejo foram administradas previamente por via alimento, três dosagens diferentes de glucan (0,1; 0,5 e 1,0%) mais um controle (0%), durante período de quatro semanas. Para aferir o efeito destes tratamentos foram avaliados parâmetros sanguíneos e plasmáticos (cortisol, proteína plasmática, glicose, contagem de leucócitos),

atividade respiratória das células fagocíticas, taxa de fagocitose e atividade de lisozimas. As avaliações foram realizadas antes e após transporte e pôde-se notar que houve aumento da atividade fagocítica nos animais alimentados com glucan; entretanto não ocorreu diferença entre as diferentes doses. Elevados níveis de cortisol e glicose são normalmente relacionados a situações de estresse e o cortisol pode ser responsável pela inibição da atividade imune não específica. Nesta pesquisa a utilização do polissacarídeo ocasionou a redução dos níveis de glicose e cortisol avaliados em dois períodos após manejo de transporte. É interessante ressaltar que estes resultados foram pronunciados nas trutas alimentadas com o menor nível de glucan (0,1%).

Siwicki; Anderson e Rumsey (1994), avaliaram o efeito de alguns imunostimulantes (MacroGard® - β -1,3/1,6 glucan; leveduras secas - *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*; Chitosan® - quitina; Evetsel® - vitaminas C, E e selênio; FinnStim® - betaína e substitutos de colina) para truta arco-íris (*O. mykiss*) com peso corporal de 200 gramas. No primeiro teste, foram avaliados apenas as leveduras e o β glucan em relação ao controle. Uma semana após o início da alimentação, verificaram-se mudanças nos parâmetros sanguíneos e plasmáticos avaliados, com elevação dos índices, superiores ao controle e ao MacroGard®. Os resultados foram diferentes ($P < 0,05$) para número de leucócitos, produção de radicais oxidativos dos neutrófilos, índice de fagocitose e, superiores em relação ao controle apenas para o hematócrito, atividade da mieloperoxidase e dos níveis de imunoglobulina. A proteína plasmática foi maior somente em relação ao controle. No segundo teste, todos os produtos foram confrontados à *S. cerevisiae* que apresentou os melhores resultados para a atividade potencial de ação dos neutrófilos, indicando que a utilização da levedura seca e íntegra ao nível de 2,7% na dieta, pode ser empregada sem comprometer a atividade imune não específica destes peixes.

Li e Gatlin III (2004) avaliaram a ação de da levedura autolisada (Grobiotic™ AE – mistura comercial contendo levedura parcialmente autolisada, derivados lácteos e produtos secos de fermentação) e Brewtech® (levedura parcialmente autolisada) na alimentação do híbridos de “striped bass” (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) alimentados com níveis de inclusão 1 e 2% de cada produto na dieta. Após sete

semanas (peso inicial dos peixes $91,4 \pm 4,3$ g) pode-se observar que os tratamentos que apresentavam derivado da levedura na sua composição apresentaram maior ganhos de peso em relação ao controle, porém apenas pode-se constatar melhoria significativa ($P \leq 0,05$) na eficiência alimentar dos animais alimentados com Grobiotic™. Com quatro semana após início (peixes com 19,7 g) da administração dos produtos, foram encontrados maior produção de radicais oxidativos pelos neutrófilos, de lisozimas e ânions de superóxido intra e extra celular, em contraste com os animais alimentados com a deita controle revelando a eficiência da suplementação de glucan e/ou quitina presente nas leveduras. Além destas avaliações também foi concluído um desafio com a bactéria *S. iniae*. Foi detectada diferença ($P < 0,01$) na redução da mortalidade em 19 dias. Os animais que não receberam os derivados da levedura em sua alimentação apresentaram taxa de sobrevivência equivalente a 50% enquanto os demais tratamentos variam entre 73,3 a 90% sendo a seqüência dos tratamentos mais eficientes: Brewtech® 1,0%, Grobiotic™ AE 2,0%, Brewtech® 1,0% e Grobiotic™ AE 1,0%.

Similarmente Li e Gatlin III (2005), forneceram ao “striped bass” (64,5 g e 118 g), quatro dietas com composição centesimal semelhante, apenas variando a adição dos produtos citados anteriormente (GroBiotic®-A, 2% na dieta e Brewtech®, 1 e 2%) e mais uma dieta controle. De forma geral, os tratamentos que continham levedura em sua composição apresentaram melhores índices de ganho de peso e na eficiência alimentar do início ao fim do período da coleta de dados (0 a 16 semanas). Assim como no valor de eficiência alimentar verificada ao final do experimento, já após quatro semanas, notou-se melhoria significativa no ganho de peso ($P < 0,05$) dos animais alimentados com tratamento contendo a maior suplementação de levedura autolisada (Brewtech® - 2%), em comparação aos demais tratamentos. Não foram detectadas diferença significativa ($P > 0,05$) na produção de radicais oxidativos, lisozima plasmática e produção intracelular de ânions superóxido nos macrófagos, ao final de 16 semanas. Os índices de sobrevivência observados (até 21 semanas) frente à realização de desafio com *Mycobacterium marinum* foram significativamente maiores ($P < 0,05$) para os animais alimentados com as dietas contendo 1% de Brewtech® e o GroBiotic®-A, a partir da

12ª semana , com último tratamento conferindo aumento significativo ($P < 0,05$) da resistência dos animais à infecção, considerando-se o período total de observação.

Além dos polissacarídeos, a levedura é uma considerável fonte de ácidos nucléicos. Estes compostos são preconizados por interferir nas funções de defesa do organismo em várias espécies aquáticas (LI; GATLIN III, 2003) e podem representar de 12 a 20% do nitrogênio total da levedura, principalmente representado por bases purina e pirimidina. A importância destes nucleotídeos deve-se ao fato de que eles estão diretamente relacionados a numerosas funções fisiológicas de ordem genética e inclusive, como mediadores do metabolismo energético (LI e GATLIN III, 2004).

De acordo com Li; Gatlin III (2006), os nucleotídeos estão presentes naturalmente em todos os organismos, tanto os de origem vegetal como animal, na forma de nucleotídeos livres e ácidos nucléicos (componente de DNA e RNA). Estes compostos são definidos como moléculas constituídas de bases purina (adenina, xantina, hipoxantina e guanina) ou uma pirimidina (uracila, timina e citosina), açúcar ribose ou uma 2-deoxiribose e um ou mais grupos de fosfato. Na alimentação, possuem ação de palatabilizante, no comportamento alimentar (químico-atrante) e na biossíntese de aminoácidos não essenciais.

Os resultados práticos observados em peixes, ocasionaram aumento da taxa de crescimento em estágios iniciais de desenvolvimento, da qualidade larval, alterações na estrutura intestinal, maior tolerância ao estresse, possivelmente relacionada à inibição parcial dos efeitos imunossupressores gerados pela da liberação do cortisol, e por fim, a modulação das respostas imunológicas adaptativas e inatas, pela indução na maturação, ativação e proliferação de linfócitos, da atividade fagocítica realizada pelos macrófagos e melhoria da resposta das imunoglobulinas, gerando inclusive, aumento da resistência a infecções (vírus, bactérias) e ataque de parasitos (BURRELLS, et al. 2001; LI; GATLIN III, 2006).

Grimble e Westwood (2000 apud GATLIN III; LI, 2005) relatam que os oligonucleotídeos não são considerados como nutrientes essenciais na alimentação animal, porém existem indícios que em situações de injúria e/ou reparos, tem-se aumento da exigência por estas moléculas pelo organismo. Em condições de

deficiência podem ocorrer danos aos rins, fígado intestino e das funções imunológicas. Isto deve-se possivelmente à incapacidade dos agentes responsáveis pela produção dos nucleotídeos (mucosa intestinal, células hematopoéticas, linfócitos e tecido nervoso) em suprirem com eficiência sua demanda nestas situações, sendo cabível a realização de suplementação por oligonucleotídeos na dieta animal. Sakai et al. (2001); Li e Gatlin III (2006) ainda citam que este componente pode possuir ação na melhoria da qualidade da flora intestinal, atuando como um pré-biótico.

Uma justificativa importante utilizada para explicar a suplementação deste nutriente na dieta animal deve-se ao fato que, em mamíferos, o processo de “turnover” dos nucleotídeos nos eritrócitos, linfócitos, coração e cérebro depende de segura via suplementação, porém os pesquisadores citam que isto ainda não foi comprovado para os peixes. A absorção das bases nitrogenadas e dos nucleotídeos inicia-se pela remoção dos grupos fosfato, seguido pela clivagem dos açúcares resultando na produção de bases de pirimidina e purina. A eficiência de absorção pode ser influenciada por fatores ambientais e/ou fisiológicos como, por exemplo, a presença de certas substâncias no ambiente que podem reduzir a ação de nucleases e proteases do animal (LI; GATLIN, 2006).

Peres e Oliva-Teles (2003) relatam existir diferentes respostas dos peixes à suplementação de ácidos nucléicos. Tal fato pode estar envolvido, em parte, pelas diferentes condições em que as células de levedura se desenvolvem, podendo gerar produtos ou fontes com diferente composição química dos nucleotídeos.

Li; Lewis e Gatlin III (2004) avaliaram os efeitos de oligonucleotídeos de leveduras na resposta imunológica do híbrido do “striped bass” através da adição na dieta do produto Ascogen P[®]. Não foi constatada diferenças significativas na performance de crescimento, eficiência alimentar, composição da carcaça, lisozimas plasmáticas e hematócrito. Entretanto, houve diferença ($P= 0,011$) na produção de radicais oxidativos dos peixes alimentados com a suplementação. No ensaio de desafio com *S. iniae* observou-se incremento ($P<0,05$) na taxa de sobrevivência assim como no aumento da resposta imunológica pela ação de anticorpos, porém não significativamente diferente em contraste com a dieta controle. Estes resultados

reforçam a hipótese de que os nucleotídeos de modo geral, potencializam as ações mais rápidas e de caráter específico (LI; GATLIN III, 2006) do sistema imunológico em comparação à atuação do glucan.

Da mesma forma, Burrels; Willians e Forno (2001) avaliaram a eficiência indutiva do sistema imunológico em função da administração de nucleotídeos (0,2% Optimûn = 0,03% nucleotídeo na dieta) e do β -glucan (0,2% MacroGard® na dieta) para salmonídeos: “atlantic salmon” (*Salmo salar*), “coho salmon” (*O. kisutch*) e truta arco íris (*O. mykiss*), alimentados previamente com as dietas teste (três semanas), e expostos a infecção viral, bacteriana e a uma infestação parasítica, cujo os agentes utilizados foram respectivamente: *Vibrioanguillarum*, *salmon anaemia* (ISA) vírus, *Piscirickettsia salmonis* e *Lepeophyheirus salmonis*. Os animais que receberam o tratamento contendo nucleotídeos apresentaram maior resistência aos desafios realizados em relação ao polissacarídeo os quais sempre apresentaram taxas de mortalidade significativamente maiores, dependendo da fase do desafio. Segundo os autores, esta tendência evidenciada pode ser explicada pela possível redução dos níveis de substâncias imunossupressoras como o cortisol e prostaglandina E₂. Entretanto, os animais alimentados com β -glucan apresentaram maior atividade dos macrófagos evidenciada pela maior atividade respiratória destas células, quando foram expostos ao desafio bacteriológico.

Li e Gatlin III (2006) avaliaram a eficiência de nucleotídeos em aumentar a capacidade de resposta imune não específica em carpas (*Cyprinus carpio*), com peso médio de 100 gramas. De modo geral foram encontrados os melhores resultados (atividade de lisozimas, quantidade de ânios superóxido produzidos por macrófagos e atividade fagocítica), quando empregou-se dose de 15 mg RNA oriundo de *S. cerevisiae*, animal dia⁻¹, encontrados após três dias do início da administração oral. Além dessas avaliações foi realizado desafio com *Aeromonas hydrophila*, através de injeção intraperitoneal através do qual pôde-se verificar que decorridas 12 horas após a inoculação, os animais suplementados com nucleotídeos não apresentavam mais a presença destas bactérias no rim, sangue e fígado, diferentemente dos peixes alimentados com a dieta controle, portanto, ficando claro

a eficiência deste imunostimulante no controle e combate de infecções causadas por esta bactéria.

Nem sempre o emprego da levedura e/ou imunostimulantes pode ser traduzido na melhoria da resposta dos peixes submetidos a determinada condição de estresse e/ou pela maior eficiência na utilização dos nutrientes da dieta. Tal fato foi observado por Bridle et al. (2005) que afirmam que os polissacarídeos podem não ser eficientes em incrementar a resistência de peixes ao ataque de patógenos.

Valle et al. (2002), avaliaram os efeitos da adição da levedura desidratada de álcool, como pró-nutriente, administrada pela alimentação durante o processo de reversão sexual de tilápias do Nilo. Foram elaboradas dietas isoprotéicas (35% PB) e isoenergéticas (3.500 kcal ED/kg de ração) suplementadas com 0,0; 1,0; 2,0 e 4,0% de *S. cerevisiae*. Verificou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos e, em todos os casos registraram-se sinais clínicos de deficiência nutricional como escoliose, lordose, deformidades da cabeça e boca além da alta taxa de mortalidade, permitindo que os autores afirmassem que as dietas não se mostraram capazes de atender as exigências nutricionais das larvas, mesmo para aquelas que continham a levedura em sua composição.

Li et al. (2005), avaliaram o efeito da suplementação de levedura parcialmente autolisada (Brewtech® - 2% na dieta) e nucleotídeos (Optimûn – 0,2% na dieta – 0,03% nucleotídeos) singularmente ou em conjunto na alimentação (2 e 0,2%) de juvenis de “red drum” (*Sciaenops ocellatus*, 21,1± 0,5 g). Não houve aumento significativo ($P>0,05$) no ganho de peso, na taxa de sobrevivência, índice víscero-somático e gordura visceral em nenhum tratamento em relação à dieta controle. A composição corporal não apresentou alterações com exceção da quantidade de lipídeos que foi maior quando houve a suplementação de nucleotídeos. A quantidade de cortisol também não apresentou variação. Ocorreu 100% de mortalidade para todas os tratamentos após decorridas 48 horas ao começo do desafio com *Amyloodinium ocellatum*.

Choudhury et al. (2005), também não observam diferenças ($P<0,05$) no ganho de peso e nas taxas de crescimento específico, eficiência alimentar e protéica, assim como na quantidade de hemoglobulina e número de eritrócitos em “rohu” (*Labeo*

rohita L., 13,40±0,17 g) alimentados com suplementação crescente de RNA proveniente de levedura (0,1; 0,2 e 0,4% ácido ribonucléico na dieta). Também foi avaliada a ação da quitina (presente na composição da levedura seca) aos níveis de 25 e 50 mg/kg de ração, igualmente não ocorrendo nenhuma diferenciação significativa. Entretanto, nas avaliações realizadas para detectar o comportamento dos índices relacionados à resposta imune não específica, notou-se para os animais alimentados com a ração contendo 0,4% de ácido nucléico, significativa ($P<0,05$) elevação em comparação ao controle, na taxa respiratória dos fagócitos, verificada pela quantificação produtiva de superóxidos e também na quantidade de proteína plasmática, que pode ser utilizada para mensurar indiretamente a atividade do sistema imunológico pela estimativa da produção de imunoglobulinas. Além disso, pode-se verificar o aumento da resistência destes animais à infecção ocasionada por *Aeromonas hydrophila* quando a inoculação deste patógeno foi realizada 60 dias após o início do fornecimento das dietas teste.

Peres e Oliva-Teles (2003) forneceram dietas isoprotéicas e isoenergéticas, suplementadas com ácido nucléico oriundo de levedura (6,2 e 12,4%), perfazendo respectivamente, 12 e 22% do nitrogênio dietético das dietas. O estudo foi conduzido com juvenis (13,3 g) do “sea bass”, *D.labrax*, alimentados por período de 10 semanas. O fornecimento das dietas que continham suplementação de RNA não ocasionou redução da ingestão nem da eficiência alimentar, porém os peixes alimentados com dietas contendo 22% de ácido nucléico apresentaram redução significativa ($P<0,05$) na taxa de crescimento. A presença destes nucleotídeos no alimento, também induziu a ocorrência de maiores índices hepatosomáticos e da excreção de nitrogênio por via urinária e branquial, conseqüentemente reduzindo a retenção de nitrogênio corporal. Similarmente pode-se verificar redução significativa ($P<0,05$) na retenção energética.

Abreu, Roviero e Urbinati (2006a) estudaram a ação do β 1-3 glucan no perfil hematológico do pacu (92,0 g) por meio de injeção intraperitoneal (0, 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/100$ g de peso vivo) e via oral (0,1; 0,5 e 1,0%). O polissacarídeo não provocou alteração hematológica por nenhuma via de administração nas doses testadas para os índices de hematócrito, volume corpuscular médio, eritrócitos e hemoglobina. De

acordo com os autores, os baixos valores destes parâmetros estavam associados a ocorrência de infecção dos animais por *Flexibacter colmnaris* em ambos os ensaios, o que adicionalmente, pode exemplificar a ineficiência do polissacarídeo na interrupção e/ou redução do processo infeccioso, mediante ao manejo e condições estabelecidas pelos pesquisadores.

Entretanto, a utilização em adição a outro componente pode gerar efeito sinérgico com o do imunestimulante. Verlhac et al.(1998) não encontraram relação positiva entre o fornecimento de glucan com a função imune não específica para truta arco íris ($146,2 \pm 4,2$ g). Quando este polissacarídeo foi fornecido conjuntamente com o ácido ascórbico (1000 mg/ kg dieta) houve efeito de interação positiva e significativa ($P < 0,10$) no aumento de produção de lisozimas em comparação aos efeitos singulares. Também verificou-se neste trabalho, resposta positiva do sistema imunológico específico dos animais alimentados com o polissacarídeo detectado pelo aumento da produção de anticorpos mediante a prática de vacinação.

Os resultados de outros estudos realizados para investigar a ação destes imuno estimulantes podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Estudos envolvendo a ação de imunostimulantes para espécies aquáticas

Agente	Espécie tamanho/categoria	Melhor Dose/Via	Resultados	Resistência patógenos	Referência
Nucleotídeo (RNA)	<i>Cyprinus carpio</i>	15 mg/100g proteína por peixe/dia	↑ atividade lisozimas, leucócitos, fagocitose e produção de superóxido	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sakai, et al. (1999)
Ácido Nucléicos	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	0,6 a 4,1% ou 7,5 a 50% de L.I. na dieta total	↑ crescimento e retenção de nitrogênio na carcaça.	-	Runsey; Winfree e Hughes (1992)
β-glucan (Sigma)	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> , pós larvas estágio 11	10 mg/l, imersão por 1 hora	↑ atividade de lisozimas	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Misra, et al. (2004)
Glucan (Sigma Chemical Co.)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , 20 a 10 gramas.	100 µg/animal – injeção, 100 µg/mL –imersão pó 30 minutos.	↑ taxa fagocitose, número de leucócitos, neutrófilos, monócitos e produção RO.	-	Jeney e Anderson (1993)
β-1,3 e 1,6 glucan	<i>Onchorhynchus mykiss</i> , 300 – 400 gramas	1 mL solução 1% M-glucan/peixe, injeção	↑ atividade dos macrófagos, da atividade de lisozimas.	↑ da atividade bactericida dos macrófagos (<i>Aeromonas salmonicida</i>)	Jorgensen et al. 1993.
Células de <i>S. cerevisiae</i>	<i>Sparus aurata</i> , 175 gramas	10 g levedura /kg de dieta	↑ atividade de lisozimas, número de fagócitos e da atividade respiratória dos leucócitos.	-	Rodríguez et al. (2003)
MacroGard®, Fibolse® e VitaStim®	<i>Sparus aurata</i> , 0,3 e 5 a 10 gramas	10 g/kg ração (2 semanas)	↓ taxa de mortalidade, ↑ atividade respiratória dos fagócitos	<i>P. damselae</i> subespécie <i>piscicida</i>	Couso et al. (2003)
MacroGard®	<i>Sparus aurata</i> , 0,3 e 5 a 10 gramas	ou 1 g/kg dieta (6 semanas)	↓ taxa de mortalidade, ↑ atividade respiratória dos fagócitos	<i>P. damselae</i> subespécie <i>piscicida</i>	Couso et al. (2003)
<i>S. cerevisiae</i> , Autoisado e Parede Celular	pintado, <i>Pseudoplatystoma coruscans</i> , 15 centímetros	5,0% de inclusão na dieta destes ingredientes.	↑ desempenho e sobrevivência	-	Gaiotto (2005)
MacroGard®	truta arco iris (<i>O. mykiss</i>)	1,0% na dieta (3 semanas)	↑ da atividade respiratória intra e extra celular, ↑ atividade fagocítica	-	Dugenci e Candan (2003)
β-1,3 glucan	pacu (<i>P. mesopotamicus</i>) 225,3 gramas	0,1 a 1,0% na dieta (30 dias)	prevenção dos efeitos negativos de estresse.	-	Abreu, Roviero e Urbinati (2006b)

MacroGard®, Fibolse® e VitaStim®: fontes de β-1,3/1,6 glucan

↑: aumento

↓: redução

-: dados não apresentados

3. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

Avaliar o emprego da levedura íntegra seca e derivados, como pró-nutrientes, para juvenis de pacu, por meio do estudo dos parâmetros de desempenho, composição de carcaça e análises plasmáticas.

Avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta e energia “in vivo” e da proteína “in vitro” para o pacu.

4. Material e Métodos

4.1. Local, Condições Experimentais e Delineamento

Este estudo foi dividido em duas fases realizadas entre julho de 2005 e março de 2006, nas dependências do laboratório de Aqüicultura, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil (latitude 21° 59' S, longitude 47° 26' W e altitude de 634 m). Na primeira fase foi avaliado o desempenho dos pacus alimentados com levedura e seus derivados e na segunda fase, foram realizados ensaios de digestibilidade.

No experimento de desempenho a iluminação ambiente foi controlada por temporizador, mantendo fotoperíodo constante de 12 horas luz e escuro, respectivamente. De acordo com as recomendações citadas por Ozório, Avinimelech e Castagnolli (2004) para sistemas de produção intensivos e fechados e também Pavanelli; Eiras e Takemoto (2002), monitorou-se alguns parâmetros de qualidade de água (pH, temperatura, oxigênio disponível condutividade e salinidade) diariamente, através do equipamento Horiba, modelo U-10, e devidamente controlados mediante às condições indesejáveis de variação. A amônia e o nitrito também foram monitorados semanalmente através de “kits” comerciais marcas

Alcon LabconTest Amônia® e Macherey-Nagel Quantofix®, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros da qualidade de água (média ± desvio padrão) observados durante a condução do experimento.

Ensaio	Parâmetros						
	pH	Temperatura (°C)	O.D. (mg/l)	Salinidade (%)	Condutividade (mS/cm)	Amônia (NH ₃ /NH ₄ ⁺) (ppm)	Nitrito (NO ₂ ⁻) (mg/l)
Desempenho	7,22±0,43	27,17±0,47	5,02±0,97	0	0,192±0,069	0,0 – 0,25	0,0 - 1,0
Digestibilidade	6,47±0,47	26,95±0,38	4,25±0,38	0	0,032±0,003	0,0 – 0,25	0,0 - 1,0

Para o ensaio de desempenho, foi utilizado sistema fechado de circulação de água, composto por 35 caixas de fibra de vidro (60,0 cm x 55,0 cm x 50,0 cm) com capacidade de armazenamento útil equivalente a 130 L (Figura 2). O sistema continha duas unidades responsáveis pela manutenção da qualidade da água; na primeira, filtrando a parte sólida e, na segunda, uma unidade biológica capaz de utilizar o nitrogênio excretado pelos animais e contido na água (Figura 3). A vazão individual dos aquários foi suficiente para garantir sete trocas diárias de todo volume dos tanques, resultando em vazão aproximada de 0,6 L/m.



Figura 2. Sistema de aquários utilizados no ensaio desempenho.



Figura 3. Sistema de eliminação de poluentes da água.

No ensaio de digestibilidade utilizou-se sistema aberto com o uso de água tratada, tanto para os aquários de coleta, como para os de alimentação (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Aquários de coleta de fezes



Figura 5. Tanques de alimentação utilizados no ensaio de digestibilidade

Os animais utilizados na condução dos testes foram obtidos de dois produtores comerciais (Piscicultura Águas Claras, Mococa-Sp e Universidade de Marília, Marília-SP) e uma estação de reprodução (Duke Energy Brasil, Salto Grande-SP).

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x2+1, constituído por três ingredientes (levedura, levedura autolisada e parede celular), dois níveis de inclusão (2,5 e 5,0%) e mais um controle (sem a inclusão de leveduras ou derivados), totalizando sete tratamentos com cinco repetições.

4.2. Ingredientes e Rações

A escolha e inclusão dos ingredientes foram baseadas na disponibilidade, preço, composição centesimal e pela observação de resultados de pesquisas concluídas por: Souza (1989), National Research Council (1993), Pádua (1996), Meurer (1999), Miranda et al. (2000), Fernandes, Carneiro e Sakomura (2000, 2001), Abimorad e Carneiro (2002), Ortuño et al. (2002), Li, Gatlin III (2003), Jaramillo e Glatin III (2004), Ozório, Cyrino e Nascimento (2004), Fernandes, Lochmann e Bocanegra (2004). Para a formulação das dietas, utilizaram-se os resultados da composição centesimal, energética e mineral dos ingredientes (Tabela 3), como banco de dados para o Programa de Formulação Super Crac[®], versão 4.2, tomando como base os valores originais dos mesmos. Com o objetivo de assegurar a eficiência nutricional das dietas, além dos valores brutos (energia e proteína) foram também empregados e fixados os valores digestíveis dos ingredientes utilizados para espécies onívoras, quando não encontrado para o gênero *Piaractus*. A levedura íntegra e derivados foram doados pela empresa Usina Santo Antônio S/A, localizada no município de Sertãozinho-SP.

A composição centesimal dos ingredientes das dietas e da carcaça foi determinada em triplicata, com base na matéria seca seguindo os procedimentos metodológicos da AOAC (1990). Para a obtenção dos valores de energia bruta,

foram utilizadas bombas calorimétricas (marca Parr, modelo 1108) para os ingredientes e para fezes e rações (modelo MS 10 A). Na determinação da composição centesimal foi utilizado o fator de conversão 5,8 para o cálculo do valor protéico da levedura e derivados (SGARBIERI et al, 1999).

Tabela 3. Composição centesimal¹ dos ingredientes utilizados na formulação das dietas para o ensaio de desempenho e digestibilidade “in vivo”

Ingredientes	MS	PB	EE	FB	MM	ENN	Ca	P _{total}	Energia Bruta
	%								Kcal/kg
Farelo de soja	87,47	51,61	1,13	5,84	6,73	34,68	0,21	0,85	4586
Farinha de peixe	94,32	59,94	8,10	1,27	27,05	3,64	5,53	2,11	4242,5
Glúten de milho	91,59	69,09	1,99	1,02	1,34	26,56	0,01	0,15	5485,0
Quirera de arroz	89,16	8,53	1,63	0,42	0,49	88,94	0,02	0,25	4149,0
Milho (grão moído)	89,11	10,38	4,17	2,57	1,02	81,86	0,03	0,19	4284,0
Farelo de trigo	90,53	17,87	3,44	9,75	5,74	63,20	0,06	1,01	4289,0
Levedura íntegra	93,53	38,70	0,34	0,44	3,61	56,92	0,01	0,74	4398,0
Levedura autolisada	94,50	39,14	0,10	0,29	6,22	54,24	0,06	0,64	4421,0
Parede celular	93,23	37,46	0,22	0,34	4,13	57,85	0,04	0,71	4490,0
Óleo de soja*									9333,0

¹ com base na matéria seca

* composição tabelada – Software Super Crac 4.2

MS = matéria seca, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo, FB = fibra bruta, MM = matéria mineral, ENN = extrativos não nitrogenados, Ca = cálcio, P_{total} = fósforo total.

Os ingredientes foram moídos (granulometria igual ou inferior a 1,0 mm), misturados e extrusados (Exteec, 40 kg/h) e secos em forno a gás, com circulação de ar forçada (equipamento Prógas, modelo 2012), conforme mostram as Figuras 6 e 7.



Figura 6. Extrusora Exteec utilizada para confecção das deitas experimentais



Figura 7. Forno a gás utilizado para secagem da rações após processo de extrusão

4.2.1 Dietas Desempenho

Foram produzidas rações extrusadas, isoprotéicas e isoenergéticas, cujas formulações são apresentadas na Tabela 4. As suplementações com a levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular, apresentaram níveis crescentes na dieta total, nas quantidades de 2,5; 5,0% e mais um controle, totalizando sete tratamentos (Tabela 5).

Tabela 4. Formulação e composição analisada das deitas experimentais utilizadas nos ensaios zootécnicos e de digestibilidade (ração referência)

Ingredientes	Dietas							
	Controle	LI	LI	LA	LA	PC	PC	Referência
		2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	
Levedura íntegra	-	2,5	5,0	-	-	-	-	-
Levedura autolisada	-	-	-	2,5	5,0	-	-	-
Parede celular	-	-	-	-	-	2,5	5,0	-
Farelo de soja	20	19	19	19	19	17,5	18	19,5
Farinha de peixe	17	17	14,5	17	15,1	16,5	16	17
Glúten de milho	10	9,5	10,5	9,5	9,9	11	10	10
Quirera de arroz	20	20	19,5	20	19	20	20	19
Milho (grão)	15	14,5	14,5	14,5	15	15	14	16
Farelo de trigo	17	16,5	16	16,5	16	16,5	16	18
Óleo de soja	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Suplemento vitamínico e mineral**	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Nutrientes	Composição analisada(%)							
Matéria seca	97,73	96,64	96,67	96,07	97,76	96,99	96,80	97,61
Proteína bruta (P. Digestível)*	32,68 (26,88)	32,66 (26,71)	32,40 (26,59)	32,17 (26,73)	32,95 (26,56)	32,14 (26,84)	31,87 (26,62)	31,54 (26,86)
Extrato etéreo	1,38	1,87	1,32	1,70	1,38	1,80	1,70	1,50
Fibra bruta	2,19	2,28	2,33	1,83	2,22	2,14	1,95	2,18
Matéria mineral	7,24	7,19	6,63	7,28	7,13	7,09	6,99	7,54
Extrato não nitrogenado	56,52	56	57,32	57,02	56,32	56,83	57,50	57,25
Energia Bruta (E. Digestível)*	4319,41 (3162,17)	4339,88 (3134,1)	4329,83 (3105,8)	4298,81 (3134,8)	4364,94 (3104)	4345,89 (3151,1)	4302,97 (3111,6)	4378,75 (3135,8)
Ca*	0,94	0,93	0,80	0,94	0,84	0,91	0,89	0,94
P total*	0,72	0,73	0,69	0,73	0,70	0,71	0,71	0,73
Lisina*	1,46	1,51	1,52	1,51	1,54	1,38	1,36	1,45
Metionina + cistina*	1,15	1,14	1,13	1,14	1,13	1,12	1,08	1,15
Triptofano*	0,30	0,31	0,31	0,31	0,31	0,29	0,29	0,30

*valores calculados pela matriz formuladora Super Crac 4.2

**Composição do suplemento mineral e vitamínico Supre Mais (Níveis de garantia por kg de ração): Minerais (em mg): ferro= 50,0; cobre= 3,0; manganês= 20,0; zinco= 150,0; iodo= 0,10; cobalto= 0,01 e selênio= 0,10. Vitaminas: A= 600,0 UI; D3= 1.000,0 UI; E= 60,0 mg; K3= 12,0 mg; B1= 24,0 mg; B2= 24,0 mg; B6= 20,0 mg; B12= 24,0 mg; ácido fólico= 6,0 mg; pantotenato de Ca= 60,0 mg; ácido ascórbico (C)= 240,0 mg; biotina= 0,24 mg; colina= 325,0 mg; niacina= 120,0 mg.

Tabela 5. Classificação das dietas teste

Tratamento	Nível (% total na dieta)	Nomenclatura
Levedura Íntegra	2,5	LI2,5
Levedura Íntegra	5,0	LI5,0
Levedura Autolisada	2,5	LA2,5
Levedura Autolisada	5,0	LA5,0
Parede Celular	2,5	PC2,5
Parede Celular	5,0	PC5,0
Controle	0	C0

4.2.2. Dietas do ensaio de digestibilidade

Na composição das dietas para o experimento de digestibilidade, foi utilizado 69,5% da dieta referência (Tabela 4), previamente extrusada e triturada em moinho (1,0 mm), mais 0,5% de marcador inerte (Cr_2O_3 – 100% matéria seca), conforme recomendações de Shipton e Britz (2001) e 30% dos ingredientes-testes - LI, PA e PC (CHO; KAUSHIK, 1990; De SILVA; ANDERSON, 1995). Após a mistura, para obtenção de massa homogênea, as rações (Tabela 6) foram peletizadas, secas (50°C por 12 horas) e armazenadas (-18°C).

Tabela 6. Composição centesimal das dietas testes utilizadas nos ensaios de digestibilidade

Nutrientes	Dietas teste		
	Levedura íntegra	Levedura autolisada	Parede celular
	%		
Matéria seca	93,32	94,00	92,06
Proteína bruta	33,74	35,06	34,45
Extrato etéreo	1,19	1,59	1,82
Fibra bruta*	1,65	1,61	1,62
Matéria mineral	6,62	7,00	6,72
Extrato não nitrogenado	56,80	54,74	55,39
Energia bruta (kcal/kg)	4325,16	4318,46	4279,17

*valores calculados de acordo com a composição centesimal da ração referência e dos ingredientes teste.

4.3. Desempenho Zootécnico e Índices Corporais

Foram utilizados 350 alevinos de pacu ($11,98 \pm 1,72$ g; $8,50 \pm 0,46$ cm), divididos em 10 animais por caixa com 35 unidades experimentais (sete tratamentos com cinco repetições). Os animais foram aclimatados por 15 dias e alimentados “ad libitum” com as rações experimentais, duas vezes ao dia (8:00 e 19:00 hs), durante período de 90 dias.

Foram realizadas quatro pesagens individuais (0, 30, 60 e 90 dias), e nas realizadas aos 0 e 90 dias, também foram aferidos os comprimentos dos peixes (Figura 8). Na última avaliação, também foram sacrificados dois peixes, por meio de doses letais de anestésico, escolhidos aleatoriamente de cada unidade experimental, para análise visual dos órgãos internos, pesagem do fígado e vísceras (Figura 9). Em todas as avaliações, os animais foram previamente sedados através de solução com benzocaína (0,03 g/l).



Figura 8. Biometria (comprimento total) dos pacus aos 90 dias de alimentação



Figura 9. Necropsia e pesagem dos pacus após 90 dias de alimentação

Foram avaliados os parâmetros:

- Consumo de ração (CR)
CR = Consumo total no período(de cada unidade experimental)/número de indivíduos
- Ganho de peso absoluto (GPA):
GPA = (peso final da unidade experimental – peso inicial da unidade experimental)/número de indivíduos
- Conversão alimentar (CA):
CA = alimento ingerido/ganho de peso (kg/kg)
- Taxa de eficiência protéica (TEP):
TEP(g/g) = ganho de peso (g) / proteína na dieta (g)
- Taxa de crescimento específico (TCE):
TCE(%/dia) = [(ln peso corporal final – ln peso corporal inicial)/ tempo em dias]x 100
- Sobrevivência (S):
S (%)= [(número de peixes total – número de peixes mortos) / número de peixes total] x 100
- Índice hepato-somático (IHS):
IHS (%) = (peso tecido hepático / peso corporal) / 100
- Índice Víscero-somático (IVS):
IVS (%) = (peso das vísceras / peso corporal) / 100

Na última avaliação também foram coletados, aleatoriamente, dois animais de cada unidade experimental e mortos por meio de choque térmico, sendo imediatamente congelados (-18°C) para posteriores análises de composição de carcaça.

4.4. Ensaios de digestibilidade “in vivo” e “in vitro”

Na metodologia de digestibilidade “in vivo” foram utilizados 180 animais ($43,92 \pm 6,61$ g), divididos e confinados em seis gaiolas (30 peixes cada), sendo cada uma delas alocada em um tanque com capacidade para 300 L cada (Figura 5). Foi utilizado o método indireto para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína e energia das fontes testadas (LI, LA, PC). O método consistiu em acrescentar um marcador inerte (Cr_2O_3) na formulação do alimento colocado na proporção de 0,5% na dieta (SHIPTON, 2001). As coletas foram realizadas em três aquários cilindro-cônico em fibra de vidro (Figura 3), com capacidade para 250 L equipados com sistema de aeração e recipiente coletor de fezes refrigerado e com fluxo contínuo de água (DE SILVA; ANDERSON, 1995). Os ensaios foram realizados segundo recomendação de Furuya et al. (2001).

Os peixes foram alimentados “ad libitum” três vezes ao dia (8:00, 12:00, 18:00 hs) com as respectivas dietas contendo o marcador. Foram utilizadas três gaiolas para cada tratamento, perfazendo-se três repetições. Uma hora após a última alimentação os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,01 g/l), as gaiolas limpas e então, transferidas para os aquários de coleta, onde os peixes permaneceram por um período de 12 horas.

Devido a grande quantidade de fezes gerada, foi necessário realizar duas coletas, uma após seis horas e outra, no final do período de 12 horas. Imediatamente após a coleta, este material foi todo transferido para placas de Petri, permanecendo em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 50°C por 24 horas. O material seco foi pesado e mantido em congelador (-18°C) até posteriores análises.

As coletas foram realizadas até a obtenção de oito gramas de matéria seca para cada repetição, necessárias para a realização das análises. Quatro dias anteriores ao início da coleta das excretas, foi fornecida a dieta contendo o marcador (de cada tratamento), sendo que o tempo total para a obtenção de todas as amostras foi de 30 dias.

A avaliação do teor do óxido de crômio das fezes e das dietas foi determinada através da digestão nitro-perclórica, e a leitura (absorbância) realizada através de espectrofotômetro, com comprimento de onda 550 nm, conforme descrito por Furukawa e Tsukahara (1966), sendo obtidas três leituras de cada amostra (repetições).

Para a determinação dos CDA dos nutrientes energia (EB) e proteína (PB), foram utilizadas fórmulas descritas por Cho e Kaushik (1980) e Sugiura et al. (1998), CDA_1 e CDA_2 , respectivamente:

$$CDA_1 = 100/30 \times [CDA_{dt} - (70/100 \times CDA_{dr})]$$

$$CDA_2 = [(a \times CDA_{dt}) - (0,7 \times b \times CDA_{dr})] / (0,3 \times c)$$

onde:

CDA = Coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente e energia no ingrediente teste;

CDA_{dr} = Coeficiente de digestibilidade aparente no nutriente da dieta referência;

CDA_{dt} = Coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente da dieta teste;

a = concentração do nutriente na dieta teste;

b = concentração do nutriente na dieta basal e

c = concentração no nutriente no ingrediente teste.

Neste estudo também foram avaliados os coeficientes de digestibilidade “in vitro” da proteína dos ingredientes – LI, LA e PC, utilizando-se metodologia descrita por Sgarbieri (1996) em que a pepsina simula digestão ácida e em seguida, a pancreatina atua como agente digestor em condição alcalina. Após este procedimento, o material digerido foi centrifugado (3.000 rpm por 15 minutos) separando-se em seguida o sobrenadante para realização da digestão e destilação da proteína bruta de uma amostra de cinco mL (AOAC, 1990). Para a obtenção dos resultados foram realizadas quatro repetições de cada ingrediente, e aplicou-se a seguinte fórmula para a obtenção dos valores digestíveis (SGARBIERI, 1996):

$CDP_{IV} (\%) = (Nd - Nae) / Nta$, onde:

CDP_{IV} = coeficiente de digestibilidade “in vitro” da proteína;

Nd = nitrogênio digerido;

Nae = nitrogênio da autodigestão da enzima (branco);

Nta = nitrogênio total da amostra.

4.5. Testes Plasmáticos

Aos 90 dias de alimentação, durante a biometria final e após a aplicação do anestésico, foram escolhidos aleatoriamente dois animais para a colheita de sangue por punção da veia caudal (Figura 10).



Figura 10. Coleta de sangue da veia caudal

Foi coletado um mL de sangue de cada peixe, utilizando-se seringas previamente heparinizadas. O material foi colocado individualmente em tubos do tipo “Eppendorf”, devidamente identificados e conservados em gelo. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, por cinco minutos (BARONE, 2006). O sobrenadante (plasma) foi retirado e armazenado em temperatura de -18°C até posteriores análises de proteína plasmática total, ácido úrico, glicose e uréia, através de metodologia enzimática colorimétrica de ponto final (uréia, glicose e ácido úrico - Marca Laborlab), colorimétrico de ponto final (proteína - Marca Laborlab) e imunoenensaio enzimático (cortisol - Marca: Diagnostic Systems Laboratories, Inc.) por meio de “kits” conforme demonstrado na Figura 11.

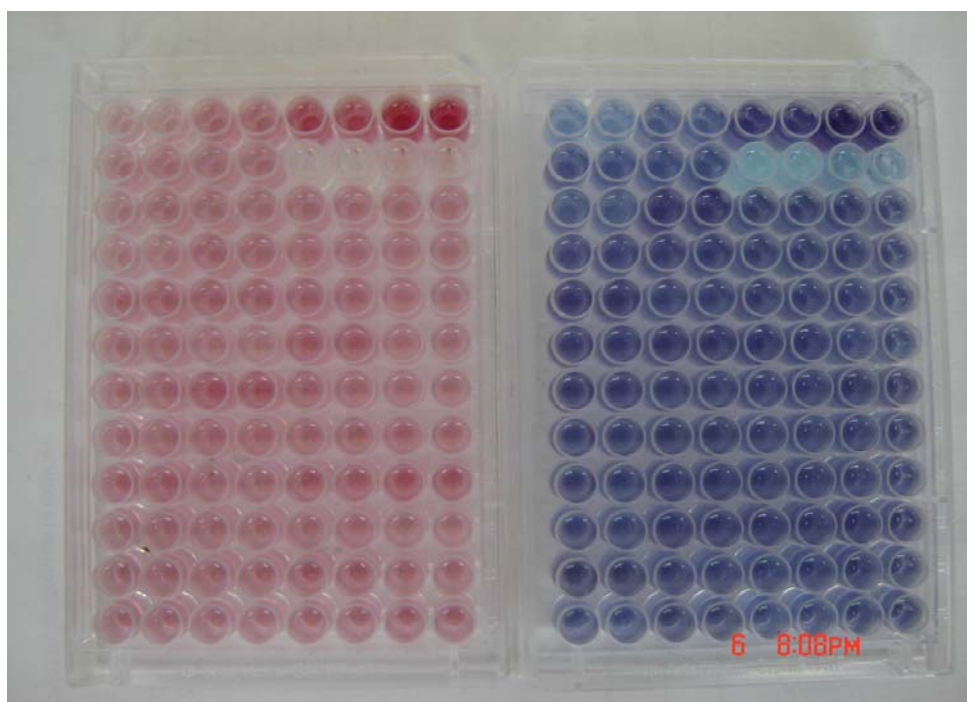


Figura 11. Placas utilizadas nas leituras das concentrações dos índices plasmáticos



Figura 12. Equipamento utilizado para leitura das concentrações plasmáticas (leitor ELISA)

As leituras das amostras foram realizadas por meio de leitor ELISA Labsystem Multiskan Version 8,0 (Figura 12), e os valores das concentrações destes compostos plasmáticos foram calculados através dos valores de absorbância das amostras e da curva padrão, determinados através do programa computacional Labsystems Gênesis V3.03.

4.6. Análise estatística e Químico-Bromatológicas

A Tabela 7 apresenta um resumo dos procedimentos adotados para a obtenção dos valores das metodologias descritas anteriormente.

Tabela 7. Descrição das análises realizadas durante o experimento

Tipo de análise	Local de realização	Referência	Repetições por amostra
Composição centesimal*	Laboratório de Aqüicultura FZEA/USP	AOAC (1990)	triplicata
Ca e P	Laboratório de Minerais FZEA/USP	AOAC (1990)	duplicata
Energia Bruta	Laboratório de Metabolismo Ruminal FZEA/USP; Laboratório de Nutrição Animal FCA/UNESP	AOAC (1990)	duplicata
Fibra Bruta	Laboratório de Bromatologia FZEA/USP	AOAC (1990)	duplicata
Óxido de cromo	Laboratório de Aqüicultura FZEA/USP	Furukawa e Tsukahara (1966)	triplicata
Análises Plasma	Laboratório de Fisiologia Animal FZEA/USP	Referências contidas nas respectivas bulas dos “kits”	duplicata

* exceção da determinação da fibra bruta

Os valores médios dos testes realizados nos ensaios zootécnicos e de digestibilidade foram submetidos à análise de variância (GLM) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade realizadas pelo aplicativo estatístico SAS (Statistical Analysis Systems). Adicionalmente, para o estudo do efeito dos fatores (ingrediente e nível) e suas interações, foi realizada a aplicação do método de contrastes ortogonais também empregando-se o mesmo nível de significância.

5. Resultados e Discussão

5.1. Desempenho

Durante o período de condução do experimento de desempenho (90 dias) não foi observada nenhuma ocorrência de mortalidade nas 35 unidades experimentais. Tal fato pode ser explicado em parte, pela ação de alguns componentes (oligossacarídeos, nucleotídeos e complexos de proteína com polissacarídeos) presentes na composição da *S. cerevisiae* e derivados (autolisado e parede celular) que quando utilizados na alimentação podem acarretar no aumento da resposta imune dos animais inclusive aumentando a eficiência produtiva, como observado por Sakai (1999), Sakai et al. (2001), Scapinello et al. (2001ab), Ortuño et al. (2002), Li e Gatlin III (2003). Li e Gatlin III (2004), Li, Lewis e Gatlin III (2004). Adicionalmente, os peixes ficaram submetidos a uma condição estável perante o controle das condições ambientais mantidas em faixa ideal ao desenvolvimento da espécie, supondo que não tenha ocorrido nenhuma situação de estresse neste período. Os valores dos parâmetros da água estão apresentados na Tabela 2.

A análise de variância apenas demonstrou diferença ($P < 0,05$) entre os sete tratamentos nos índices de consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) e na taxa de eficiência protéica (TEP), cujos valores são apresentados na Tabela 8. O (CR) consumo de ração dos peixes alimentados com o tratamento controle foi significativamente maior ($P < 0,05$), acarretando inclusive na observação dos piores resultados da conversão alimentar (CA) e na taxa de eficiência protéica (TEP), porém apenas significativamente diferente em relação aos tratamentos PC5,0 e LA2,5 respectivamente para cada índice.

Tabela 8. Valores médios do Consumo de Ração (CR), Ganho de Peso Individual Total (GPA), Conversão Alimentar (CA), Taxa de Eficiência Protéica (TEP), Taxa de Crescimento Específico (TCE), Índice Víscero-somático (IVS) e Índice Hepato-somático (IHS) para o pacu

Tratamentos	Índices						
	CR (g)	GPA (g/peixe)	CA (g/g)	TEP	TCE (%/dia)	IVS (%)	IHS (%)
LI2,5	735,55 ^b	55,55	1,29 ^{ab}	2,33 ^{ab}	1,86	8,63	1,59
LI5,0	844,19 ^{ab}	66,51	1,24 ^{ab}	2,39 ^{ab}	2,04	9,09	1,67
LA2,5	930,39 ^{ab}	77,02	1,19 ^{ab}	2,55 ^a	2,17	8,56	1,42
LA5,0	832,97 ^{ab}	65,80	1,23 ^{ab}	2,48 ^{ab}	2,02	9,54	1,51
PC2,5	755,73 ^{ab}	55,99	1,32 ^{ab}	2,25 ^{ab}	1,88	9,11	1,26
PC5,0	898,57 ^{ab}	73,64	1,18 ^a	2,52 ^{ab}	2,13	9,17	1,72
C	990,55 ^a	69,87	1,40 ^b	2,15 ^b	2,08	9,06	1,40
Erro Padrão	51,47	5,65	0,05	0,09	0,08	0,47	0,14
Valor de P dos tratamentos	0,0164	0,0837	0,0477	0,0308	0,0707	0,8003	0,2454
Contrastes							
C v DEMAIS ⁺	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LI ⁺ e LA ⁺ v PC ⁺	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LI ⁺ v LA ⁺	**	*	ns	ns	*	ns	ns
LI2,5 v LI5,0	ns	ns	**	**	ns	ns	ns
LA2,5 v LA5,0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PC2,5 v PC5,0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Valores seguidos de letras diferentes, nas colunas, diferem estatisticamente (P<0,05)

⁺ independente do nível

V - versus

* (P<0,05); ** (P<0,01); ns não significativo (P>0,05)

LI2,5 – dieta com 2,5 % de levedura íntegra; LI5,0 - dieta com 5,0 % de levedura íntegra; LA2,5 dieta com 2,5 % de levedura autolisada; LA5,0 - dieta com 5,0 % de levedura autolisada, PC2,5 - dieta com 2,5 % de parede celular; PC5,0 - dieta com 5,0 % de parede celular; C – dieta controle.

O maior consumo de alimento pelos peixes que não receberam levedura na dieta pode ser explicado, em parte, por possível diferença da palatabilidade das rações, gerando assim diferença no comportamento alimentar. Pereira da Silva e Pezzato (2000) encontram estas diferenças entre vários ingredientes utilizados na composição de dietas para tilápias. A levedura de cana-de-açúcar pôde ser classificada como um ingrediente de média atrato-palatabilidade em contraposição aos ingredientes de origem animal (ovo integral liofilizado, farinhas de crisálidas, peixes, carne e camarão). No entanto, no presente estudo as dietas contendo LA e PC não apresentaram redução dos índices de ingestão de alimento, devido à presença da levedura nas dietas.

Rumsey et al. (1991a) também relacionaram o aumento da CA (1,17 a 4,58) em truta arco íris alimentadas com níveis crescentes de levedura seca a redução do consumo pelos peixes, ocasionada pela piora da palatabilidade da dieta, em decorrência dos altos níveis de ácidos nucléicos. Higuera et al. (1981) também observaram, em trutas, a redução da ingestão de alimento que apenas continha a levedura (*Hansenula anomala*) como fonte fornecedora de proteína, causando a redução da eficiência protéica. Tal comportamento não foi presenciado na alimentação dos pacus, indicando que os bons índices de desempenho não estão relacionados à palatabilidade das dietas e conseqüente a variação de consumo entre os peixes.

Os melhores valores de CA foram obtidos para os tratamentos PC 5,0; LA 2,5 e 5,0. Contrariamente ao que ocorreu nos peixes alimentados com a dieta controle, em que os parâmetros de desempenho foram influenciados pela alta ingestão de ração, observou-se para os dois tratamentos citados anteriormente, alto consumo de ração e paralelamente verificou-se os dois maiores ganho de peso individual (GPA), taxa de eficiência protéica (TEP) e de crescimento específico (TCE). A melhor CA apresentada por PC5,0 pode ser parcialmente justificada devido ao fato de que este tratamento continha a maior quantidade de polissacarídeos insolúveis (glucans) e manano proteínas (SGARBIERI et al. 1999; SCAPINELLO et al. 2001ab), preconizados por aumentar o desempenho produtivo dos animais (SAKAI, 1999; ROMERO; GOMEZ-BASAURI, 2003; GRIESHOP, 2003; FLICKINGER, 2003).

Comparando-se todos os tratamentos, PC5,0 é o que possui em sua composição a maior quantidade de polissacarídeos não amiláceos (β -glucans), uma vez que a parede celular pode representar até 30% do peso seco da célula e estes polímeros de monossacarídeos podem representar até 60% da composição desta estrutura (ROMERO; GOMEZ, 2003). Ações de polissacarídeos insolúveis presentes na parede celular tem sido comprovada em aumentar o crescimento dos peixes (SAKAI, 1999; LI; GATLIN 2004; GANNAM, 2005), assim como foi observado para os pacus alimentados com levedura e derivados em relação ao tratamento controle.

Similarmente ao observado com *P. mesopotamicus*, Carvalho (2002) constatou que, respectivamente, a utilização de PC e LA em relação a LI acarretou

maior TCE (1,93; 1,79 e 1,74) mesmo utilizando níveis muito superiores para a tilápia do Nilo. Desta forma, nota-se que neste estudo a utilização de levedura em altos níveis não acarretou efeito supressor do crescimento devido à presença de alta quantidade de ácidos nucléicos e complexos insolúveis. Adicionalmente, pode-se notar que os peixes alimentados com a PC apresentaram os maiores índices, indicando possível resposta fisiológica à presença de grande quantidade de polissacarídeos na dieta. A utilização da LA e PC como fonte protéica empregadas nas proporções de 19,80 e 42,50% respectivamente (25% da proteína bruta da dieta), foram eficientes em melhorar o desempenho e a eficiência protéica possivelmente induzidos por um maior consumo das dietas contendo estes ingredientes que por sua vez, possuem alta concentração de ácido glutâmico, um agente palatilizante. Como abordado anteriormente, neste estudo, os pacus alimentados com os tratamentos contendo PC e LA também apresentaram altos índices de ingestão em relação ao controle.

No tratamento LA2,5 pode-se observar tendência a menores índices víscero (IVS) e hepato somáticos (IHS), comparativamente os menores, demonstrando um indício do aumento da deposição de tecidos (muscular) em relação aos outros tratamentos ao invés do aumento deposição de gordura visceral. Tal fato pode ser também averiguado por uma tendência na redução da quantidade de gordura e cinzas presente na carcaça do pacu e pelo maior valor protéico (Tabela 9) para os tratamentos contendo LA, porém não diferente ($P>0,05$) dos outros tratamentos. Durante a necropsia não foi observado qualquer tipo de lesão ou alteração na estrutura dos fígados, indicando que a utilização da levedura e derivados não acarretou distúrbios relacionados à metabolização dos ácidos nucléicos, como citado por Caballero-Córboba e Sgarbieri (2000).

Os índices zootécnicos publicados por Ozório, Cyrino e Nascimento (2004) demonstram que pacus alimentados com até 30% de levedura íntegra na dieta apresentaram CA e TCE respectivamente a 1,1 e 1,9 % por dia, indicando a capacidade da espécie em utilizar a levedura íntegra como eficiente fonte de nutrientes, em decorrência dos altos valores dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e do lipídeo das dietas experimentais apresentadas por estes

autores. Neste presente estudo, o principal objetivo não foi avaliar a levedura e derivados como fonte de nutrientes, mas sim como um aditivo alimentar e, por meio dos parâmetros de desempenho observados, pode-se constatar que a *S. cerevisiae* pode interagir positivamente na melhora da eficiência nutricional da dieta, sem ser necessariamente utilizada como fonte de nutrientes.

Na análise por contrastes ortogonais, pode-se verificar que não houve diferença ($P>0,05$) das fontes em relação ao controle, independentemente do nível utilizado (Tabela 8). Entretanto isso não ocorreu quando comparou-se somente LA, LI e PC. Neste caso houve efeito significativo ($P<0,05$) para CR (881,68 e 789,67 g), GPA (71,41 e 61,03 g/peixe) e, conseqüentemente na TCE (2,09 e 1,95 %/dia), nos quais LA apresentou as maiores médias em comparação a LI. Devido ao fato de que a CA e a TEP foram melhores para LA, pode-se concluir que o processo de rompimento da parede celular neste caso, acarretou maior disponibilidade e conseqüente utilização dos nutrientes da *S. cerevisiae* pelo pacu, da mesma forma como foi observado com trutas, por Rumsey et al. (1991b).

Ainda, por meio dos contrastes ortogonais procurou-se averiguar a tendência dos índices, em função do acréscimo do nível de inclusão de cada ingrediente de 2,5 para 5,0%. Apenas foi encontrada diferença ($P<0,05$) na melhoria da CA e na TEP mediante ao aumento da inclusão do ingrediente LI nas dietas (Tabela 8), indicando neste caso, que o pacu pode responder proporcionalmente ao aumento da inclusão de LI nas dietas, melhorando a eficiência produtiva.

Na avaliação da levedura como fonte protéica na alimentação do pacu (peso inicial 28,1 a 55,4 g), Pádua (1996) encontrou valores reduzidos em comparação aos índices obtidos neste estudo. Os peixes alimentados com 29,88% de levedura seca na dieta apresentaram TCE equivalente a 2,58% e a CA 1,59. Esta diferença pode estar particularmente relacionada à maior quantidade de ácidos nucléicos e de parede celular, presente na composição da dieta, que podem atuar de forma negativa no desempenho animal, assim como o efeito do desbalanço do perfil de aminoácidos da dieta acarretado pela baixa quantidade de aminoácidos essenciais presentes neste tipo de ingrediente (RUMSEY et al. 1991; SGARBIERI et al. 1999; VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000). Os valores de IHS não apresentaram variação

significativa mediante aumento da quantidade de *S. cerevisiae* (2,00 a 2,18%) na dieta, uma vez que o processo de metabolização dos ácidos nucléicos está diretamente relacionado à atividade do fígado; elimina-se, neste caso, a hipótese da ação tóxica ocasionada pela crescente inclusão de levedura e assim de ácidos nucléicos ingeridos (CABALLERO-CÓRBOBA; SGARBIERI, 2000).

Gaiotto (2005) não encontrou diferença significativa ($P > 0,05$) nos valores referentes à eficiência da utilização protéica de juvenis de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans*, alimentados com as mesmas fontes e níveis avaliados neste estudo. De modo geral, os valores da TEP variaram de 1,47 a 1,67%, valores abaixo dos encontrados neste trabalho. Similarmente, os animais alimentados com o tratamento LA2,5 apresentaram os maiores índices, porém neste caso, o tratamento controle apresentou o segundo maior valor. O autor justifica os baixos valores a um excesso de proteína bruta na dieta. Este excedente pode acarretar a utilização deste nutriente como fonte energética em vez da sua deposição na composição corporal (BACCARIN; PEZZATO, 2001).

O efeito do emprego destes mesmos ingredientes, como pró-nutrientes, sobre a utilização da proteína dietética da tilápia do Nilo, é demonstrado por Hisano (2005). Foram observados valores da TEP que variaram de 2,27 a 2,57%, com diferença para o efeito entre tratamentos ($P < 0,01$) de LI em comparação a LA e PC que apresentam maior eficiência na utilização da proteína. Neste estudo o autor cita que LA apresentaram os melhores valores de desempenho produtivo em relação a LI e PC, principalmente evidenciada por melhor CA, que variou de 1,19 a 1,35 entre todos os tratamentos, além de bons resultados evidenciados no ganho de peso. Através da utilização da equação de regressão, o autor cita que o nível ótimo a ser empregado na dieta para esta espécie é da ordem de 1,30 a 1,75% de suplementação de LA na dieta, portanto valores inferiores aos observados para o pacu.

Baccarin e Pezzato (2001) encontraram piores índices para os tilápias no Nilo alimentadas com 10% de levedura desidratada de álcool na dieta. A TEP observada em duas fases experimentais (40 e 74 dias) foram respectivamente de 1,47 e 0,71% seguidas pelos valores de 2,11 e 4,14 da CA demonstrando que a incorporação da

levedura na fase de alevinagem desta espécie pode trazer prejuízos em decorrência da qualidade da fonte protéica e por uma deficiência em vitaminas na dieta. Os peixes alimentados com a dieta que não continha levedura em sua composição apresentaram melhor CA (1,58 e 2,33) e TEP (2,06 e 2,33 %), justificados como ineficiência nutricional das dietas que continham levedura acarretando em aumento do consumo de alimento neste caso não convertido em ganho de peso. Deste modo neste estudo, o emprego da levedura e derivados não acarretou aos pacus tais problemas relatados anteriormente.

A melhoria do desempenho do *P. mesopotamicus* pôde ser alcançada mesmo mediante a utilização de pequenos níveis de inclusão de levedura e/ou derivados, mesmo que por um longo período, similarmente apresentado por Li e Gatlin III (2003), utilizando níveis de inclusão de até 4,0% de levedura íntegra e Li e Gatlin III (2004, 2005) com 2,0% levedura autolisada, todos trabalhos realizados com o “striped bass”. A partir do uso LA, o bom rendimento pôde ser justificado ao aumento da eficiência do sistema imune não específico, verificado pela alta taxa produtiva de substâncias envolvidas neste processo, mesmo os animais estando em estado permanente de infecção. Este melhor desempenho dos animais (pacus) alimentados com LA também foi confirmado neste estudo.

Contrariamente ao observado neste trabalho, Li et al. (2005) não encontraram melhores índices de desempenho do “red drum” alimentados com níveis *S. cerevisiae* e/ou ácidos nucléicos, neste caso justificado por uma deficiência energética das dietas. Entretanto, os autores encontram maior acúmulo significativo ($P \leq 0,05$) de lipídeo na carcaça destes animais indicando que a suplementação de nucleotídeos pode interferir no metabolismo lipídico e/ou de ácidos graxos, porém não influenciando a TEP.

De modo geral, pode-se observar que o emprego da levedura e derivados pode melhorar a produtividade das espécies, devido inclusive a maior eficiência alimentar e imunológica. Entretanto, a respostas dos animais é bastante variada gerando grande dificuldade na determinação de um padrão de uso. Em parte, esta dificuldade pode estar relacionada à grande variação da composição das fontes de levedura encontradas no mercado, pois além da composição centesimal pode-se

também verificar a existência de significativa variação da quantidade de carboidratos insolúveis (oligossacarídeos) e de nitrogênio proveniente de ácidos nucléicos, considerados como agentes imunoestimulantes (SAKAI, 1999).

Sobre a quantidade de fibras insolúveis (oligossacarídeos) em valores máximos e mínimos, publicados para a levedura íntegra, autolisado e parede celular, observa-se respectivamente para cada fonte, os seguintes valores: 1,1 a 2,60; 0,27 a 1,0; 3,80 a 23,45% em fibras insolúveis (YAMADA et al. 2003; CABALLERO-CÓRDOBA; SGARBIERI, 2000; VILELA; SGARBIEIR; ALVIM, 2000; CABALLERO-CÓRDOBA; PACHECO; SGARBIERI, 1997; SGARBIERI et al. 1999; CHAUD; SGARBIERI, 2006). Consequentemente para as fontes de levedura citadas anteriormente, a quantidade de RNA, apresentada nestes trabalhos variam de 5,7 a 9,0; 5,6 a 7,9 e 1,83 (apenas um valor para de nucleotídeo para a PC). Além desta variação evidente entre a origem das fontes, deve-se considerar que não existe um padrão da quantidade destes componentes entre LI, LA e PC. Da mesma forma, este comportamento é similar quanto aos padrões da composição centesimal e de aminoácidos essenciais.

5.2. Composição de Carcaça

Não houve diferença ($P > 0,05$) na avaliação da composição de nutrientes na carcaça, demonstrando que a suplementação de levedura não influenciou o metabolismo e sua conseqüente deposição (Tabela 9). Nem mesmo perante a avaliação por contrastes, comparando-se apenas o efeito entre as fontes LI, LA e PC (independentemente do nível empregado) e do efeito referente ao aumento do nível, dentro de cada ingrediente, pode demonstrar qualquer tipo de variação significativa.

Tabela 9. Valores médios de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral na composição corporal dos pacus alimentados com as dietas teste

Tratamentos	%			
	Umidade	Proteína Bruta	Extrato Etéreo	Matéria mineral
LI2,5	65,93	15,30	13,69	4,09
LI5,0	65,39	15,36	13,99	4,08
LA2,5	66,71	15,81	12,52	3,77
LA5,0	66,59	15,50	12,55	3,99
PC2,5	66,23	15,44	13,17	4,08
PC5,0	65,66	15,44	13,79	3,94
C	65,72	15,71	13,19	4,13
Erro Padrão	0,44	0,23	0,46	0,11
Contrastes				
C versus DEMAIS ⁺	ns	ns	ns	ns
LI ⁺ e LA ⁺ versus PC ⁺	ns	ns	ns	ns
LI ⁺ versus LA ⁺	ns	ns	ns	ns
LI2,5 versus LI5,0	ns	ns	ns	ns
LA2,5 versus LA5,0	ns	ns	ns	ns
PC2,5 versus PC5,0	ns	ns	ns	ns
Valor de P dos tratamentos	0,2932	0,6724	0,1957	0,2918

Valores seguidos de letras diferentes, nas colunas, diferem estatisticamente (P<0,05)

⁺ independe do nível

*(P<0,05); ** (P<0,01); ns não significativo (P>0,05)

LI2,5 – dieta com 2,5 % de levedura íntegra; LI5,0 - dieta com 5,0 % de levedura íntegra; LA2,5 dieta com 2,5 % de levedura autolisada; LA5,0 - dieta com 5,0 % de levedura autolisada, PC2,5 - dieta com 2,5 % de parede celular; PC5,0 - dieta com 5,0 % de parede celular; C – dieta controle.

Pádua (1996) cita que o aumento da incorporação de levedura íntegra na dieta de juvenis de pacu, provocou tendência no aumento de proteína e umidade, consequentemente reduzindo a proporção de extrato etéreo. Este comportamento é justificado pelo aumento da concentração de ácidos nucléicos que podem interferir tanto no processo de absorção de nutrientes bem como pela disponibilidade destes elementos na dieta (minerais e proteína). Comparativamente, os valores encontrados são menores (PB 12,77 a 13,24%; EE 8,70 a 10,06% e MM 1,75 a 2,05%), aos observados neste trabalho. Essa diferença pode ser explicada pelos valores de umidade (73,41 a 75,09%) encontrados, que foram em média 8,1% maiores.

Ozório, Cyrino e Nascimento (2004) encontraram valores para a composição corporal em 13,9 a 18,0% (PB), 11,0 a 12,9% (EE), 2,2 a 3,0% (MM) e 67,2 a 71,9% (umidade), para pacus alimentados com níveis crescentes de levedura íntegra. Estes índices foram apresentados ao final da fase de arraçamento e em média (16,5% PB e 12 % EE), são muito próximos aos obtidos neste trabalho. Não houve tendência da redução da quantidade de lipídeos, nem mesmo da incorporação de proteína na carcaça devido à crescente inclusão de levedura na dieta do pacu, em até 30%, demonstrando desta forma nenhuma adversidade na qualidade de carcaça devido ao emprego da *S. cerevisiae* na alimentação da espécie.

Sobre o aspecto do efeito comparativo da levedura e derivados, Carvalho (2002) apenas encontrou variação na presença de maior quantidade ($P < 0,05$) PB na composição corporal da tilápia do Nilo, alimentadas com LA e PC em relação a PI e a dieta controle. Em Baccarin e Pezzato (2001), observa-se menor valor de PB na composição centesimal de tilápias alimentadas com levedura desidratada de álcool e também maior acúmulo de lipídeos, significativamente ($P < 0,05$) superior aos valores apresentados pelos animais alimentados com a dieta controle. Este comportamento é explicado pelo valor biológico da proteína da levedura, atribuído ao desbalanceamento de aminoácidos, resultando na redução da síntese protéica e consequentemente, transformando-se em reservas energéticas, o que não foi verificado para o pacu.

Li et al. (2005) também encontrou maior deposição de lipídeos na carcaça do “red drum” alimentados com levedura íntegra e/ou nucleotídeos. Os pesquisadores observaram que o aumento foi proporcional à quantidade de nucleotídeos na dieta, explicada por uma possível ação destes componentes no metabolismo lipídico de alguns tecidos. Li e Gatlin III (2003) utilizando níveis semelhantes de levedura íntegra na dieta do “striped bass” não encontraram variação na composição centesimal.

Hisano (2005) também não verificou algum efeito do emprego do pró-nutriente (LI, LA e PC) sobre a composição de filés da tilápia do Nilo, assim como em Gaiotto (2005) que não observou diferença significativa na composição da carcaça de pintados alimentados com níveis e fontes iguais aos utilizados no presente estudo.

5.3. Parâmetros Plasmáticos

Observa-se pela Tabela 10, como para a composição de carcaça, não ocorreu diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) quanto aos parâmetros plasmáticos (proteína, glicose, uréia, ácido úrico e cortisol). Similarmente na avaliação por contrastes, não foi constatado efeito entre as fontes LI, LA e PC (independentemente do nível empregado) e ao aumento do nível de inclusão de 2,5 para 5,0% testados para cada ingrediente.

Tabela 10. Valores médios dos índices plasmáticos de glicose, proteína, uréia, ácido úrico e cortisol dos pacus após 90 dias de alimentação

Tratamentos	Parâmetros				
	Glicose (mg/dL)	Proteína (g/dL)	Uréia (mg/dL)	Acido úrico (mg/dL)	Cortisol (µg/dL)
LI2,5	125,68	2,00	14,72	1,83	15,40
LI5,0	104,55	2,00	14,23	2,00	11,64
LA2,5	104,59	2,01	13,62	1,97	13,41
LA5,0	109,82	1,94	13,78	1,69	11,73
PC2,5	125,60	2,01	13,17	1,89	17,36
PC5,0	96,89	2,05	14,39	1,95	16,23
C	112,80	2,03	14,76	1,70	17,28
Erro Padrão	13,50	0,086	0,85	0,12	1,88
Contrastes					
C versus DEMAIS ⁺	ns	ns	ns	ns	ns
LI ⁺ e LA ⁺ versus PC ⁺	ns	ns	ns	ns	ns
LI ⁺ versus LA ⁺	ns	ns	ns	ns	ns
LI2,5 versus LI5,0	ns	ns	ns	ns	ns
LA2,5 versus LA5,0	ns	ns	ns	ns	ns
PC2,5 versus PC5,0	ns	ns	ns	ns	ns
Valor de P dos tratamentos	0,6879	0,9849	0,8111	0,4063	0,1573

Valores seguidos de letras diferentes, nas colunas, diferem estatisticamente (P<0,05)

⁺ independente do nível

* (P<0,05); ** (P<0,01); ns não significativo (P>0,05)

LI2,5 – dieta com 2,5 % de levedura íntegra; LI5,0 - dieta com 5,0 % de levedura íntegra; LA2,5 dieta com 2,5 % de levedura autolisada; LA5,0 - dieta com 5,0 % de levedura autolisada, PC2,5 - dieta com 2,5 % de parede celular; PC5,0 - dieta com 5,0 % de parede celular; C – dieta controle.

A uréia e o ácido úrico, presentes no plasma podem ser utilizados como indicativos de distúrbios causados pela excessiva ingestão do nitrogênio não protéico e neste caso, a excessiva quantidade de ácidos nucléicos pode surtir efeitos toxicológicos e distúrbios metabólicos gerados a partir da produção de ácido úrico e uréia, produzidos a partir das bases nitrogenadas (purinas) (RUMSEY; WINFREE; HUGHES, 1992, MORAES; MONZANI; SOUZA, 1995). Entretanto foi constatado, que os peixes possuem capacidade de degradar este composto devido à atividade de uricases, identificadas no fígado da truta arco íris (RUMSEY et al. 1991a), além de possuírem a capacidade de sintetizar aminoácidos não essenciais perante a disponibilidade de nucleotídeos (RUMSEY; WINFREE; HUGHES, 1992). Desta

forma, esta habilidade pode ser também verificada para o pacu, uma vez que não foi constatado aumento da quantidade de uréia ou ácido úrico em função do aumento da inclusão de levedura e derivados na ração.

Higuera et al. (1981) não encontram modificações significativas ($P > 0,05$) na concentração plasmática de uréia e ácido úrico, avaliada em trutas (*Salmo gairdneri*) alimentadas com dietas experimentais que apresentavam substituição total da farinha de peixe pela fonte microbiana, *H. anômala*. Os valores do ácido úrico passaram de 1,5 para 1,3 mg/100L enquanto os valores da uréia, 41,4 para 77,6 mg/100 mL, respectivamente para a dieta contendo farinha de peixe e levedura. O aumento da quantidade de uréia é justificado pelo incremento das reações catabólicas relacionadas aos nucleotídeos, enquanto que a baixa variação do ácido úrico plasmático, devido a presença de enzimas (uricasas) capazes de metabolizar esta substância. Neste estudo, os valores de ácido úrico estão próximos aos encontrados por Higuera et al. (1981), porém os dados de uréia apresentados pelos pacus são menores.

Mediante ao estado de estresse, o tecido supra renal produz hormônios corticosteróides (cortisol) que apresenta entre outras coisas, função no metabolismo de nutrientes e na regulação do equilíbrio osmótico. A glicemia também pode ser empregada como indicativo de estresse. Em decorrência de um estímulo estressor e conseqüente liberação de adrenalina/noradrenalina, ocorre um incremento da produção de catecolaminas que induzirá a hiperglicemia, através da liberação do glicogênio hepático, processo este, necessário para manter a homeostase (MOREIRA et al. 2001). Os pacus alimentados com os diferentes tratamentos não apresentaram variações ($P > 0,05$) nos níveis de cortisol e glicose plasmática indicando que não existe por parte dos ingredientes-teste, ação direta nos níveis de concentração. Adicionalmente, pode-se justificar que o estresse gerado pelo manejo realizado anteriormente à coleta do sangue não foi significativo ao ponto de causar alterações aos níveis basais.

Li et al. (2005) não encontram correlação positiva entre a suplementação de *S. cerevisiae* e/ou nucleotídeos e a redução do estresse do “red drum” submetidos à ação de estímulos estressores, justificada pelos autores a grande variação dos

níveis de cortisol apresentada entre os indivíduos. Estes valores foram de: 58,9 ng mL⁻¹ (dieta basal), 27,6 ng mL⁻¹ (dieta contendo 2% de levedura íntegra), 39,4 ng mL⁻¹ (0,2% de nucleotídeo) e 99,1 ng mL⁻¹ (0,2% nucleotídeo e 2,0% de levedura íntegra) todos verificados anteriormente ao estímulo estressor. Após o estresse, a variação verificada foi maior, sendo a média de alguns tratamentos inferiores a 100 (basal) e 200 ng mL⁻¹ (2,0% levedura). Neste trabalho, não houve variação dos níveis de cortisol (Tabela 10) do pacu em função da suplementação de levedura e derivados. Entretanto, é importante ressaltar que seria necessário a exposição destes animais a ação de um agente estressor, anteriormente a coleta de sangue, para averiguar se a levedura e derivados atuam nos processos relacionados à liberação de cortisol.

Os valores de glicose plasmática determinados para o pacu foram menores que os apresentados por Pádua (1996), em que a substituição total da farinha de peixe pela levedura na dieta de pacu, após 87 dias de alimentação, ocasionou aumento ($P < 0,05$) da glicose plasmática (178,07 mg/100 mL) em comparação aos tratamentos contendo menor substituição (121,34 – 146,48 mg/100 mL), ou seja abaixo de 29,88% na dieta. Este fato foi justificado por um possível estado de estresse nutricional e/ou pela grande presença de pentoses geradas a partir hidrólise da proteína bruta da levedura.

A atividade do sistema imune pode ser caracterizada, indiretamente, pelo aumento dos índices de proteína plasmática (albuminas e globulinas). Bagni et al. (2000) não encontraram variação na quantidade de proteína plasmática do “sea bass” alimentados com a suplementação de β -glucan e vitamina E. Em comparação aos valores determinados no presente estudo com pacus, Pádua (1996) observou valores superiores em proteína plasmática (4,37 a 5,87 g/100 mL) em *P. mesopotamicus* e observou-se nos peixes alimentados a dieta contendo a substituição total fonte protéica animal pela microbiana o menor ($P < 0,05$) valor deste parâmetro.

Jeney et al. (1997) relatam que picos de cortisol e glicose podem ser considerados como sintoma característico de situação de estresse e eventualmente podem estar correlacionados a eventos de mortalidade, assim como a baixa

quantidade de proteína plasmática, pode ser relacionada à atividade não específica, do sistema imune. Os valores de proteína plasmática (aproximadamente 2,4 g/dL) observados por Jeney et al. (1997), para a truta arco íris submetidas a estresse de transporte e alimentadas com dieta contendo doses de glucan (0,1% - melhor tratamento), foram próximos aos avaliados para os pacus para todos os tratamentos.

Siwicki, Anderson e Rumsey (1994) encontraram valores equivalentes a 6,15 e 6,27 g/dL em proteína plasmática em trutas (*O. mykiss*) alimentadas respectivamente com 0,2% β -glucan e 2,7% de *S. cerevisiae* na dieta sendo estes valores, significativamente maiores comparados com a dieta controle e também maiores aos encontrados neste estudo, com pacus. A partir destes resultados obtidos com trutas, pode-se confirmar que tanto na utilização de leveduras, em níveis reduzidos, como propriamente o β -glucan purificado, agiram eficientemente na fisiologia deste animal, induzindo o aumento significativo da quantidade de imunoglobulinas no plasma para os dois tratamentos em relação ao controle.

A ação dos nucleotídeos no incremento da proteína sérica também foi constatada por Choudhury et al. (2005) para o "rohu". A partir da suplementação crescente de ácidos nucléicos oriundos de levedura, os autores observaram valores diferentes ($P < 0,05$), 4,92 e 5,50 g/dL, respectivamente para as dietas contendo 0,2 e 0,4% em relação ao tratamento controle (3,48 g/dL). Também neste caso, os índices encontrados para o "rohu" foram maiores aos observados com *P. mesopotamicus*, no presente estudo.

Gaiotto (2005) também não encontrou valores diferentes ($P < 0,05$) na quantificação da glicose, proteína, ácido úrico e uréia para o pintado, alimentados com dietas contendo iguais fontes e doses avaliadas neste estudo, independentemente do nível empregado. Os valores encontrados foram para glicose 109,72 a 141,70 mg/dL, proteína 1,95 a 2,44 g/dL, uréia 4,78 a 5,88 mg/dL e ácido úrico 1,68 a 2,64 mg/dL. A alta quantidade de uréia no plasma dos pacus, em relação aos níveis apresentados pelo pintado, pode estar relacionada à incapacidade de metabolização do nitrogênio não protéico, detectada pela alta quantidade de uréia plasmática (RUMSEY et al. 1991a). Entretanto, não foi possível comparar

estes resultados com outros obtidos para a mesma espécie, principalmente enfocando os aspectos da metabolização deste tipo de nutriente.

5.4. Ensaio de Digestibilidade

Os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína e energia da LA foram significativamente superiores aos valores determinados para a LI e PC (Tabela 11). Apenas para a energia, os valores não se diferenciaram ($P < 0,05$) em relação à PC. Esta melhora dos valores digestíveis deve ter decorrido em função do rompimento da parede celular da levedura, elevando a ação de enzimas digestivas e posterior absorção dos nutrientes presentes no conteúdo do citossol da célula da levedura (YAMADA et al. 2003).

Tabela 11. Valores dos coeficientes de Digestibilidade Aparente do Nutriente (CDA) e os respectivos valores da proteína (PD) e energia digestíveis (ED) dos ingredientes, obtidos por meio de duas metodologias de cálculo.

CDA¹				
Ingrediente	Proteína (%)	Energia (%)	PD (%)	ED(kcal/kg)
Levedura Íntegra	34,67 ^b	33,28 ^b	13,42	1463,65
Levedura Autolisada	66,48 ^a	58,59 ^a	26,02	2590,26
Parede Celular	45,71 ^b	42,33 ^{ab}	17,12	1900,62
CV (%)	19,55	19,87		
CDA²				
Levedura Íntegra	38,50 ^z	35,57 ^y	14,90	1564,37
Levedura Autolisada	74,51 ^x	59,78 ^x	29,16	2642,87
Parede Celular	54,40 ^y	41,27 ^{xy}	20,38	1853,02
CV (%)	15,55	18,71		
CDA²-CDA¹				
Levedura Íntegra	3,83	2,29	1,48	100,72
Levedura Autolisada	8,03	1,19	3,14	52,61
Parede Celular	8,69	-1,06	3,26	-47,6

CDA¹: Cálculo realizado segundo recomendações de Cho e kaushik (1990). Médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, diferem entre si (P<0,05)

CDA²: Cálculo realizado segundo recomendações de Sugiura et al. (1998). Médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, diferem entre si (P<0,05)

Tabela 12. Valores digestíveis da proteína da levedura e derivados, determinados pelo método “in vitro”.

Ingredientes	Coeficiente de Digestibilidade (%) “in vitro”	PD dos ingredientes (%)
Levedura Íntegra	68,30	26,43
Levedura Autolisada	65,03	25,45
Parede Celular	68,48	25,65

São escassas as informações sobre o valor nutricional da levedura íntegra e principalmente dos derivados avaliados na nutrição de peixes. Rumsey et al. (1991b) observaram, para a truta arco íris, aumento de 63,2 para 84,7% do CDA da proteína de LI para LA e para a energia bruta, 62,6 para 68,6%. Para a tilápia do Nilo, Hisano (2005) observou que PC apresentou os piores CDA da proteína e energia (34,70 e

86,20% respectivamente) em relação a LA (72,20 e 86,53%) e LI (69,64 e 73,56%) e, para o pintado (GAIOTTO, 2005) verificou que os valores digestíveis da proteína da PC e LI (77,45 e 71,54%) foram significativamente superiores a LA (28,48%). Desta forma, pode-se observar que existe grande variação dos valores determinados para cada espécie e, nem mesmo tem-se padronização da tendência dos coeficientes de uma fonte (LI, LA e PC) em relação à outra.

Dentre os fatores que afetam a digestibilidade dos nutrientes, os processos físico-químicos a que os ingredientes são submetidos e suas respectivas composições químicas, podem ser considerados como os principais agentes desta variabilidade de resultados (PEZZATO, 2004). Como citado anteriormente, podemos verificar grande variabilidade da constituição química das LI e conseqüentemente de LA e PC, além dos vários processos a que estes dois últimos ingredientes são submetidos, até atingirem sua forma de comercialização.

Yamada et al. (2003) também verificaram o efeito benéfico e significativo do rompimento da parede celular da levedura na digestibilidade da proteína, determinada em ratos (68,0 para 76,6%). Adicionalmente, estes autores justificam que a variação observada na determinação dos coeficientes de digestibilidade pode estar relacionada às diferentes origens (cepas e meios de cultivo) e aos processos que as leveduras podem sofrer acarretando, por exemplo, em espessamento da parede e conseqüente redução do processo de proteólise. Também em ratos, Caballero-Córdoba, Pacheco e Sgarbieri (1997) relatam o aumento significativo ($P < 0,05$) da digestibilidade aparente da proteína de LI para LA, 82,66 e 85,37%, respectivamente.

Desta forma, pode-se encontrar variação dos índices de CDA determinados, inclusive para o pacu. Abimorad e Carneiro (2004) encontraram CDA de aproximadamente 69,0% para proteína e 46,0% para a energia utilizando LI para esta espécie. Comparativamente com outros 13 ingredientes, a *S. cerevisiae* juntamente com a farinha de sangue apresentaram os menores índices digestíveis para a proteína e o pior para a energia. Os autores justificam esta baixa eficiência alimentar da levedura a um reduzido valor nutricional desta fonte (disponibilidade de aminoácido). Ozório, Cyrino e Nascimento (2004) não encontraram redução dos

CDA da proteína em dietas que continham até 38% de levedura íntegra em sua composição, demonstrando que o aumento crescente da inclusão de proteína microbiana na dieta do pacu pode ser utilizada sem que ocorra decréscimo do aproveitamento dos nutrientes da dieta. Nota-se desta forma, que os valores digestíveis da levedura e derivados não somente para o pacu, mas também para outras espécies, apresentam grande variabilidade e muitas vezes são contraditórios aos resultados esperados (GAIOTTO, 2005).

Oliva-Teles e Gonçalves (2001) observaram redução dos coeficientes de digestibilidade aparente da energia na medida em que houve aumento da quantidade de levedura na dieta para o “sea bass”. O pior resultado foi verificado na inclusão de 54,8% acarretando em CDA da energia igual a 82,3%. A digestibilidade da fração protéica também foi afetada significativamente ($P < 0,05$) neste nível de inclusão, porém quando esta dieta foi suplementada com 0,56% de metionina (aminoácido essencial geralmente encontrado em quantidades insuficientes nesta fonte) observou-se elevação significativa dos CDA (86,7 para 90,3 %).

Foster (1999) afirma que o modelo de cálculo dos valores digestíveis que não considera a relativa contribuição dos nutrientes da dieta referência e do ingrediente-teste na composição da dieta teste (contendo marcador), é inapropriada para determinar estes coeficientes. Podemos verificar no presente estudo que comparativamente, os valores determinados sem a consideração desta contribuição (CDA₁) foram menores aos obtidos pelo CDA₂, principalmente para a proteína bruta. Tal fato ocorreu devido a maior amplitude de variação dos valores de composição, fato que não ocorreu com os valores energéticos tanto da ração referência como do ingrediente teste. Estes resultados indicam que mediante a grande variação da composição centesimal das leveduras, pode-se subestimar ou superestimar os valores dos CDAs em função da utilização da metodologia de cálculo empregada podendo resultar na formulação de dietas nutricionalmente inadequadas.

Os valores obtidos através da metodologia “in vitro” (Tabela 12) não apresentaram variação significativa entre os ingredientes, indicando que em comparação aos valores “in vivo”, não existiu interação das características do ingrediente utilizado com os processos de digestão dos nutrientes, tais como baixo

valor biológico da proteína (ABIMORAD; CARNEIRO, 2004), presença da parede celular intacta, funcionando como uma barreira física contra o processo de digestão (RUMSEY et al. 1991b), e da presença de compostos insolúveis (fibras), principalmente presentes na parede celular (SGARBIERI et al. 1999). Em contraste à metodologia “in vivo” este fato pode ser evidenciado pela maior proximidade dos valores da proteína digestível da LA, que possui sua parede rompida, possibilitando a maior utilização dos nutrientes pela espécie.

Shipton e Britz (2001) avaliaram a utilização da metodologia “in vitro” para a predição dos valores digestíveis da proteína de várias fontes protéicas em comparação com a determinação da CDA “in vivo”. Neste estudo, os valores obtidos para a levedura “torula” foram de 83,4 e 82,5%, “in vivo” e “in vitro” respectivamente, portanto maiores aos relatados nesta pesquisa com o pacu. Foi utilizado sistema semelhante, ao empregado para a levedura e derivados, baseado na ação de enzimas digestivas (pH-stat) e verificaram que este método foi eficaz, podendo ser empregado para a determinação dos valores digestíveis da proteína de ingredientes para o “abalone” (*Haliotis midae* L.) permitindo desta forma, obter resultados rápidos e seguros. Entretanto, de acordo com os autores, esta metodologia não seria indicada quando utilizada em amostras protéicas que sofreram processo de hidrólise parcial e por não avaliarem com precisão, a ação de enzimas inibidoras do processo digestivo, presente principalmente, em fontes protéicas de origem vegetal (leguminosas), como normalmente pode ser verificado nos processos “in vivo”. Paralelamente, pode-se observar no presente estudo que os valores digestíveis “in vivo” e “in vitro” para LA foram muito semelhantes, o que não foi observado para a LI e PC em função da presença da parede celular intacta, dificultando o processo de digestão do ingrediente (RUMSEY et al. 1991b) e pela presença de altas quantidades principalmente na PC, de compostos com baixa digestibilidade, como fibras insolúveis (SGARBIERI et al. 1999).

6. Conclusões

A suplementação de 2,5 a 5,0% da levedura íntegra seca e/ou seus derivados teve efeito positivo sobre a eficiência alimentar e na utilização da proteína dietética, pelos juvenis de pacu não havendo efeitos indesejáveis na composição corporal e no metabolismo protéico. Entretanto, deve-se dar preferência à utilização da levedura autolisada na composição das dietas, uma vez que foram observados maiores índices para a digestibilidade da proteína e energia.

A determinação da digestibilidade “in vitro” pode superestimar os valores reais da digestibilidade dos ingredientes teste para o pacu, por não considerar neste caso, a interação entre as características físicas e de composição das leveduras e derivados.

Os estudos relacionados à aplicação da levedura e derivados na alimentação de espécies aquáticas podem gerar diferentes resultados causados principalmente pela grande variação na sua composição química, principalmente das substâncias preconizadas como imuno estimulantes.

Referências

ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 5, p.1101-1109, 2004.

ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Efeito do beta 1,3 glicano, administrado intraperitonealmente e pela dieta, no perfil hematológico de pacu (*piaractus mesopotamicus*). In: AQUACIÊNCIA, 2006a, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: AquaCiência, 2006. 1 CD-ROM.

ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Prevenção de estresse de captura em pacu (*piaractus mesopotamicus*) alimentado com beta 1,3 glicano. In: AQUACIÊNCIA, 1., 2006, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: AquaCiência, 2006b. 1 CD-ROM.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. 10 ed., São Paulo: FNP Consultoria & AgroInformaticas, 2005.

ANUALPEC, **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2005, 340 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – A.O.A.C. **Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists**. 12 ed. Washington: AOAC, 1990.

BACCARIN, A.E.; PEZZATO, L.E. Efeito da utilização de levedura desidratada de álcool em dietas para a tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 549-556, 2001.

BAGNI, M., et al. Effect of Long-term Oral Administration of an Immunostimulant Diet on Innate Immunity in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Veterinary Medicine. Serie B**, Berlin, v.47, n.10, p. 745-751, 2000.

BARONE, A.P.C. **Efeito do maracujá (*Passiflora incarnata* L. 1753) sobre o bem estar da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L. 1759)**. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

BENASSI, V.T.; CAMARGO, C.R.O.; CIACCO, C.F. Caracterização química e redução do conteúdo de ácidos nucléicos das células de levedura (*Saccharomyces* spp.) provenientes da produção de álcool de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v. 10, n. 2, p. 249-260, 1990.

BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 19, n. 5, p.457-472, 2005.

BRIDLE, A.R., et al. The effect of b-glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., challenged with amoebic gill disease – evidence of inherent resistance. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 6, p.347–376, 2005.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity. **Immunity**, Cambridge, v. 19, n. 3, p.311-315, 2003.

BURRELLS, C.; WILLIAMS, P.D.; FORNO, P.F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds¹. Effects on resistance to disease in salmonids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 199, n. 1-2, p.159 - 169, 2001.

BURRELLS, C., et al. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds. 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon / *Salmo salar* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v.199, n. 1-2, p.171- 184, 2001.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**, Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002, 429 p.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; SGARBIERI, V.C. Nutritional and toxicological avaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 3, p. 341- 351, 2000.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARIBIERI, V.C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 102- 106, 1997.

CARVALHO, M. **Utilização de levedura íntegra (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus derivados em dietas para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2002. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.

CASTRO, R., *et al.* Effect of different α -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 9, p. 529–541, 1999.

CHAUD, S.G.; SGARIBIERI, V.C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteínas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 369-379, 2006.

CHO, C.Y.; KAUSHIK, S.J. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **World Revision Nutrition and Dietetics**, London, v. 61, p. 132-172, 1990.

CHOUHDURY, D., *et al.* Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.19, n. 3, p.281-291, 2005.

COOK, M.T., *et al.* Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.14, n. 4, p.333-345, 2003.

COUSO, N., *et al.* Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, n. 1-4, p. 99-109, 2003.

DUGENCI, S.K.; CANDAN, A. The effect of some immunostimulants on the non-specific immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 27, n. 6, p. 1253-1260, 2003.

FAO – **Food and agriculture organization of the united nations - fishery statistics – aquaculture production**. FAO, Rome, v. 90, n.2, 2000.

FARIA, H.G., et al. Valor nutritivo das Leveduras de Recuperação (*Saccharomyces* sp), Seca por Rolo Rotativo ou por “Spray-dry”, para Coelho em Crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 1750-1753, 2000.

FERNANDES, J.B.K.;CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA N.K.Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n.3, p. 646-653, 2000.

FERNANDES, J.B.K.;CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA N.K.Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n.3, p. 617-626, 2001.

FERNANDES, J.B.K; LOCHMANN, R.; BECANEGRA, F.A. Apparent digestible energy and nutrient digestibility coefficients of diet ingredients for pacu *Piaractus brachypomus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Mississippi, v. 35, n. 2, p. 237-244, 2004.

FIGUERAS, A.; SANTARÉM, M.M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of b-glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam v. 64, n. 1, p. 59-68, 1998.

FLICKINGER, E.A. Oligosaccharides as functional foods: can we improve gut health? Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. In: **Proceedings of alltech's nineteenth symposium**. England:Nottingham University Press, 2003, p. 345-353.

FOSTER, I. A note on the method of calculating digestibility coefficients of nutrients provided by single ingredients to feeds of aquatic animals. **Aquaculture Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 143-145, 1999.

FREIMUND, S., et al. A new non-degrading isolation process for 1,3-b-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 54, n. 2, p. 159-171, 2003.

GAIOTTO, J.R. **Utilização de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)**. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

GANNAM, A. Immunostimulants in fish diets. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PIEXES, 1., 2005, Botucatu. **Anais...** Botucatu: 2005, p.93 -102.

GATLIN III, D.G.; LI, P. Modulation of fish health and immune responses with non-nutritive dietary supplements. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PIEXES, 1., 2005, Botucatu. **Anais...** Botucatu: 2005, p.33 - 41.

GRIESHOP, C.M. The interaction of nutrition and the immune system: a discussion on the role of energy, protein and oligosaccharides. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. In: **Proceedings of Alltech's Nineteenth Symposium**. England:Nottingham University Press, 2003, , p. 499–507.

HIGUERA, M., et al. Nitrogen utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed on the yeast *Hansenula anomala*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 69, n. 3, p. 583-586, 1981.

HISANO, H., et al. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 171-179, 2004.

HISANO, H. **Levedura desidratada íntegra, autolisado e parece celular como pró-nutrientes para tilápia do Nilo**. 2005. 94 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

JARAMILLO, F.; GATLIN III, D.M. Comparasion of purified and praticla diets supplemented with or without β -glucan and selenium on resistance of hybrid striped

bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis* to *Streptococcus iniae* infection. **Journal of the World Aquaculture Society**, Mississippi, v. 35, n. 2, p. 245-252, 2004.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.116, n. 4, p.315-329, 1993.

JENEY, G., et al. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 154, n. 1, p. 1-15, 1997.

JORGENSEN, J.B.; et al. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 3, n. 4, p. 267-277, 1993.

JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast 13-glucan stimulates respiratory burst activity of atlantic salmon (*salmo salar* L.) macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 19, n. 1, p. 43 -57, 1995.

KOLLAR, R.; STURDIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete Fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* Biomass. **Food Biotechnology**, v. 6, n.3, p.225-237, 1992.

LARA-FLORES, M., et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 216, n. 1-4, p. 193-201, 2003.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, n. 1-4, p.681-692, 2003.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Dietary brewers yeast and the prebiotic GrobiotickAE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops*_ *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**, Amsterdam, v.231, n. 5, p.445 – 456, 2004.

LI, P.; LEWIS, D.H.; GATLIN III, D.M. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.16, n. 5, p. 561 - 569, 2004.

LI, P., et al. A preliminary study on the effects of dietary supplementation of brewers yeast and nucleotides, singularly or in combination, on juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1120 - 1127, 2005.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Evaluation of the prebiotic GroBioticR-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 248, n. 1-4 p. 197-205, 2005.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. **Aquaculture**, Amsterdam, v.251, n. 2-4, p.141-152, 2006.

LIZAMA, M. de los A.P.; AMBRÓSIO, A.M. Condition Factor In Nine Species Of Fish Of The Characidae Family In The Upper Paraná River Floodplain, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 1, p.113-124, 2002.

MARQUES A.; OETTERER, M.; HORII, J. Caracterização de leveduras e seu uso na alimentação. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 89-98, 1998.

MARTINS, M.L. Cuidados básicos e alternativas de tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. **Sanidade de organismos aquáticos**. 1 ed. São Paulo: Varela, 2004, p. 357-370.

MAYNARD, L.A.; LOOSLI, J.K.; HINTZ, H.F.; WARNER, R.G. **Nutrição Animal**. Trad. Antônio B. Neiva Figueiredo. 3 ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1984, 736 p.

MIRANDA, E.C. et al. Availability of calcium : phosphorus ratio in dietes for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n. 6, p. 2162-2171, 2000.

MISRA, C.K., *et al.* Changes in lysosomal enzyme activity and protection against *Vibrio* infection in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) post larvae after bath immunostimulation with b-glucan. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 17, n. 4, p.389-395, 2004.

MEURER, S. **Digestibilidade aparente de matéria seca, proteína, e energia brutas de alguns ingredientes para juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

MORAES, G.; MONZANI, P.S.S.; SOUZA, R.H.S. Aspectos do metabolismo nitrogenado de *Piaractus mesopotamicus* (pacu) sob estresse ambiental de pH. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 8, p. 61–74, 1995.

MOREIRA, H.L.M., *et al.* **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ed. ULBRA, 2001, 199 p.

MOREIRA, I., *et al.* Uso da levedura seca por "spray-dry" como fonte de proteína para suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.2, p. 962-969, 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Fishes**. 6 ed. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1993, 114 p.

OLIVA-TELES, A.; GONÇALVES, P. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 202, n. 3-4, p. 269–278, 2001.

ORTUÑO, J., *et al.* Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p. 41-50, 2002.

OZÓRIO, R.O.A.; IFTODA, R.M.; CYRINO, J.E.P. Efeito de diferentes níveis de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre o desempenho e composição corporal da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertida sexualmente. II Congresso Ibero-americano Virtual de Aquicultura – CIVA 2003, p. 89-98, 2003. Disponível em: (www.civa2003.org). Acesso em: nov. 2004.

OZÓRIO, R.O.A.; CYRINO, J.E.P.; NASCIMENTO, A.H. Desempenho e composição corporal depois do fornecimento de proteína de levedura na dieta do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). **Relatório de Pesquisa 40 – Ajinomoto Animal Nutrition**, 2004. Disponível em: <http://www.lisina.com.br>. Acesso em: 30 maio 2006.

OZÓRIO, R.O.A.; AVNIMELECH, Y.; CASTAGNOLLI, N. In: Cyrino, J.E.P., et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. 1 ed. São Paulo: TecArt, 2004, p. 7-24.

PÁDUA, D.M.C. **Utilização de levedura alcoólica (*Saccharomy cerevisiae*) como fonte protéica na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Pisces, Teleostei): Aspectos metabólicos e desempenho produtivo**. 1996 120 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

PÁDUA, E.A. OLIVEIRA, A.C.; SGARBIERI, V.C. Importância da parede celular de levedura (*Saccharomyces* sp.) como fonte de fibra na alimentação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Porto Alegre, v. 20, n. 2, p. 233-239, 2000.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2 ed. Maringá: Eduem, 2002, 305 p.

PEREIRA DA SILVA, E.M.; PEZZATO, L.E. Respostas da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) à atratividade e palatabilidade de ingredientes utilizados na alimentação de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n.5, p. 1273-1280, 2000.

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. The effect of dietary ribonucleic acid incorporation in performance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 215, n. 1-4, p. 245–253, 2003.

PEZZATO et al. In: Cyrino, J.E.P., et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. 1 ed. São Paulo: TecArt, 2004, p. 75-169.

PIAIA, R.; RADÜNZ NETO, J. Avaliação de diferentes fontes protéicas sobre o desempenho inicial de larvas do jundiá *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 319-323, 1997.

RODRÍGUEZ, A. et al. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 96, n.3-4, p.183–192, 2003.

ROMERO, R.; GOMEZ-BASUARI, J. Yeast and yeast products, past present and future: from flavors to nutrition and health. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. In: **Proceedings of alltech's nineteenth symposium**. England: Nottingham University Press, 2003, p. 365-371.

ROSEN, G.D. Feed additive nomenclature. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 52, p. 53-57, 1996.

RUMSEY, G.D., et al. Effect of high dietary concentrations of brewer's dried yeast on growth performance and liver uricase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.33, n. 3-4, p.177-183, 1991a.

RUMSEY, G.L., et al. Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 3-4, p.185-193, 1991b.

RUMSEY, G.L.; WINFREE, R.A.; HUGHES, S.T. Nutritional value of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.108, n. 1-2, p. 97-110, 1992.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 11, n. 8, p. 683-695, 2001.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, n.1-2, p. 63-92, 1999.

SAKAI, M., et al. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 433-438, 2001.

SCAPINELLO, C., et al. Efeito da utilização de oligossacarídeo manose e acidificantes sobre o desempenho de coelhos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 1272-1277, 2001a.

SCAPINELLO, C. et al. Efeito da utilização de oligossacarídeo manose e acidificantes sobre o desempenho de coelhos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 1272-1277, 2001.

SCAPINELLO, C., et al. Efeito do uso de oligossacarídeo manose e acidificantes em rações com alto teor de amido, para coelhos em crescimento. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 1039-1043, 2001b.

SCARINCI, H.E.; UMANSKY, G.; MENDOZA, M.S.C. Estudio de la composición química de biomazas celulares de levaduras. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 40, n. 4, p. 594-602, 1990.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996, p. 368-370.

SGARBIERI, V.C., et al. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas v. 2, n. 1-2, p. 119-125, 1999.

SHIPTON, T.A.; BRITZ, P.J. An assessment of the use of chromi oxide as a marker in protein digestibility with *Haliotis midae* L. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 203, n. 1-2, p. 69-83, 2001.

SHIPTON, T.A.; BRITZ, P.J. Evaluation of an *in vitro* digestibility technique for the prediction of protein digestibility in the South African abalone, *Haliotis midae* L. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 15-21, 2002.

SIWICKI A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.41, n. 1-2, p.125-139, 1994.

SOUZA, R.R.P. **Digestibilidade aparente da proteína de dietas para o híbrido de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 1989. 79 f. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

SUGIURA, S.H. et al. Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 159, n. 3-4, p. 177-202, 1998.

VALLE, J.B.; SIQUEIRA, M.R.; SILVA, A.F.; HISANO, H.; GONÇALVES, G.S.; KOBERSTEIN, T.C.R.D. Levedura desidratada de álcool como pró-nutriente para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12., 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SIMBRAQ, 2002. p. 125.

VELHARC, V., et al. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, London, v 8, n. 6, p. 409–424, 1998.

VENTURIERI, R. **Pesque Pague no estado de São Paulo: vetor de desenvolvimento da piscicultura e opção de turismo e lazer**. São Paulo: 1 ed. São Paulo: Eco Associação para Estudos do Ambiente, 2002, 151 p.

VILELA, E. S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2000 (a).

VILELA, E.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 127-134, 2000 (b).

WATANABE, M.; RIBEIRO, M.A.; ANTUNES, S.A. Substituição da farinha de peixe por resíduos de cervejaria na ração para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 14, p. 25-43, 2001.

YAMADA, E.A., et al. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.16, n.4, p.423-432, 2003.